



Instituto Politécnico de Tomar

**Escola Superior de Tecnologia de Tomar**

# **Avaliação da Estabilidade de Amostras na Determinação de Catecolaminas Urinárias**

Relatório de Estágio

**Bruna Alexandra Simões Marques**

Mestrado em Tecnologia Química

**Tomar/Novembro/2014**





Instituto Politécnico de Tomar

**Escola Superior de Tecnologia de Tomar**

**Bruna Alexandra Simões Marques**

# **Avaliação da Estabilidade de Amostras na Determinação de Catecolaminas Urinárias**

Relatório de Estágio

Orientado por:

Doutora Dina Mateus IPT

Doutora Conceição Faustino LFG

Relatório de Estágio

apresentado ao Instituto Politécnico de Tomar

para cumprimento dos requisitos necessários

à obtenção do grau de Mestre

em Tecnologia Química







## Resumo

O presente relatório de estágio reporta o trabalho realizado durante o estágio curricular do mestrado em tecnologia química, realizado no Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo Lda, localizado em Tomar. O referido estágio decorreu de 3 Fevereiro a 31 de Julho de 2014.

O trabalho desenvolvido teve como principal objectivo estudar o efeito da temperatura e do tempo de armazenagem, em amostras de urina e controlos internos e externos, na estabilidade das catecolaminas urinárias. Para além deste estudo foram também efectuadas análises às catecolaminas urinárias no âmbito da prestação de serviços do laboratório.

Na concretização deste estudo, inicialmente analisaram-se amostras de controlo interno e externo que foram sucessivamente sujeitas a ciclos de congelação a  $-15 \pm 5^\circ\text{C}$  e descongelação à temperatura ambiente de  $25^\circ\text{C}$ . De seguida procedeu-se à análise de amostras de urina e de novos controlos, sendo que neste caso algumas foram submetidas apenas a refrigeração à temperatura de  $7 \pm 3^\circ\text{C}$ , outras a congelação/dcongelação e outras ainda a ambas as situações. Procedeu-se também à análise da *performance* cromatográfica.

A determinação das catecolaminas urinárias foi efectuada utilizando o método da cromatografia de alta eficiência, com detecção electroquímica.

Da análise à *performance* cromatográfica verificou-se que os compostos apresentavam tempos de retenção correctos, com boa resolução ( $R_s > 1,5$ ) e factor de retenção na gama ideal (2-10). Verificou-se ainda que a coluna apresentou melhor *performance* na separação da adrenalina relativamente às outras catecolaminas.

Os resultados obtidos para o coeficiente de variação das catecolaminas estavam dentro dos parâmetros permitidos, pelo que as amostras (urina/controlos) podem ser congeladas ou refrigeradas sem que isso afecte o resultado final. Para as condições utilizadas neste estudo, conclui-se que o melhor método de armazenagem das amostras de urina é a refrigeração. No caso dos controlos tanto a refrigeração como a congelação conduzem a uma boa preservação.

**Palavras-chave:** Catecolaminas, HPLC, *Performance* Cromatográfica, Estabilidade, CV



## Abstract

This internship report describes the work undertaken in the curricular training as part of the masters in chemical technology, performed at Fernanda Galo Lda, a clinical analysis laboratory located in Tomar. Training was carried out from February 3 to July 31, 2014.

The main objective of this work was to study the effect of temperature and time of storage on the stability of urinary catecholamines using urine samples and internal and external controls. In addition to this study analyses to urinary catecholamines have also been carried out as part of the external services provided by the laboratory.

First, internal and external control samples have been analysed and then subject to repeated freezing at  $-15 \pm 5^{\circ}\text{C}$  and thawing at room temperature of  $25^{\circ}\text{C}$ . Then new urine samples have been analysed and new controls made; some of them being only subjected to refrigeration at a temperature of  $7 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , others to freezing/thawing and others to both processes. Chromatographic performance has also been analysed.

The determination of urinary catecholamines was carried out using high performance liquid chromatography with electrochemical detection.

The chromatographic performance results indicated the compounds had correct retention times, with good resolution ( $R_s > 1,5$ ) and retention factor within the range (2-10). It was also found that the column had better performance in the separation of adrenaline relative to other catecholamines.

The results for the coefficient of variation of catecholamines were within the allowed parameters and therefore samples (urine/controls) can be frozen or chilled without affecting the final result. Finally, for the conditions used in this work, it was found that the best method to store urine samples is chilling. In the case of controls, both chilling and freezing can be used effectively for good preservation.

**Keywords:** Catecholamines, HPLC, Chromatographic *Performance*, Stability, CV



## **Agradecimentos**

Com esta dissertação termina mais uma escala nesta minha incerta viagem, e tal nunca teria sido possível sem o contributo e colaboração de várias pessoas e entidades às quais desejo prestar aqui os meus mais sinceros agradecimentos.

À Dra. Dina Mateus agradeço pela prontidão com que aceitou coordenar este estágio e pela dedicação, conhecimento e confiança transmitida ao longo destes meses.

Ao IPT por ter desenvolvido os esforços necessários para a concretização deste estágio.

À Dra. Conceição Faustino por me ter dado a oportunidade de realizar o estágio no seu laboratório, permitindo assim o enriquecimento da minha experiência profissional.

Ao Dr. Manuel Roque agradeço todo o conhecimento que me transmitiu ao coordenar este estágio.

Aos meus pais, pelo esforço, paciência, ajuda e sacrifício durante estes meses de estágio, pois sempre me apoiaram em tudo, tanto a nível pessoal como económico.

A todos os amigos e colegas, por todos os momentos passados nestes últimos anos no IPT.

E por fim a todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram e ajudaram a cumprir mais esta meta, um muito obrigado!



# Índice

	Página
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento e Objectivos do Trabalho.....	1
1.2. Caracterização da Empresa.....	1
2. Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica.....	5
2.1. Aminas Biogénicas.....	5
2.1.1. Catecolaminas.....	5
2.1.2. Fisiologia da Glândula Supra-Renal.....	6
2.1.3. Biossíntese das Catecolaminas.....	8
2.1.4. Importância das Catecolaminas.....	10
2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	11
2.2.1. <i>Performance</i> Cromatográfica.....	15
2.2.2. Equipamento de HPLC.....	19
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1. Equipamentos e Materiais.....	27
3.2. Métodos Analíticos.....	30
3.2.1. Extracção da Fase Sólida.....	30
3.2.2. Determinação de Catecolaminas.....	31
3.3. Controlo Externo – RIQAS (Avaliação Externa).....	33
3.4. Estudo da Estabilidade das Catecolaminas.....	34
3.4.1. Amostras Congeladas.....	34
3.4.2. Amostras Refrigeradas vs Amostras Congeladas.....	36
4. Apresentação e Discussão dos Resultados.....	39
4.1. Calibração do Método.....	39

4.2. Análise da <i>Performance</i> Cromatográfica.....	40
4.3. Controlo Externo – RIQAS (Avaliação Externa) .....	42
4.4. Estudo da Estabilidade das Catecolaminas .....	42
4.4.1. Amostras Congeladas .....	42
4.4.2. Amostras Refrigeradas vs Amostras Congeladas.....	48
5. Conclusões.....	57
6. Sugestão para Trabalho Futuro.....	59
7. Referências Bibliográficas.....	61
Anexo I - Relatório do Controlo Externo – RIQAS .....	65

## Índice de Figuras

	Página
Figura 1 - Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo.....	2
Figura 2 - Glândulas supra-renais.....	6
Figura 3 - Representação esquemática do sistema simpático-adrenal.....	7
Figura 4 - Síntese das catecolaminas a partir do aminoácido tirosina .....	9
Figura 5 - Sistema de HPLC.....	13
Figura 6 - Cromatograma com identificação dos parâmetros para calcular <i>performance</i> .....	15
Figura 7 - Resolução num cromatograma.....	18
Figura 8 - Influência de N na resposta da coluna cromatográfica.....	19
Figura 9 - Montagem típica de HPLC.....	20
Figura 10 - <i>Loop</i> .....	22
Figura 11- Introdução da amostra no HPLC.....	22
Figura 12 - Sistema de injeção da amostra com a válvula rotatória.....	23
Figura 13 - Coluna utilizada no trabalho.....	24
Figura 14 - Detector electroquímico.....	25
Figura 15 - Equipamento de HPLC.....	27
Figura 16 - Interior do detector.....	28
Figura 17 – Método de extracção da fase sólida.....	30
Figura 18 - Metodologia seguida nas amostras congeladas.....	35
Figura 19 - Metodologia seguida nas amostras de RIQAS 42 10, 42 11 e 42 13.....	37
Figura 20 - Procedimento seguido na amostra de RIQAS 42 4.....	38
Figura 21 - Curvas de calibração das catecolaminas (NA, ADR e DA).....	39

Figura 22 - Cromatograma de uma amostra de urina para análise às catecolaminas (NA, ADR e DA).....	40
Figura 23 - Variação da adrenalina no Controlo Interno.....	44
Figura 24 - Variação da noradrenalina no Controlo Interno.....	44
Figura 25 - Variação da dopamina no Controlo Interno.....	44
Figura 26 - Variação da adrenalina no Paciente A.....	50
Figura 27 - Variação da noradrenalina no Paciente A.....	50
Figura 28 - Variação da dopamina no Paciente A.....	50
Figura 29 - Variação da adrenalina no Paciente B.....	51
Figura 30 - Variação da noradrenalina no Paciente B.....	51
Figura 31 - Variação da dopamina no Paciente B.....	51
Figura 32 - Variação da noradrenalina no Paciente C.....	52
Figura 33 - Variação da adrenalina no Paciente C.....	52
Figura 34 - Variação da dopamina no Paciente C.....	52

## Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1 - Características de cromatografia de FN e FR.....	14
Tabela 2 - Características das colunas analíticas .....	24
Tabela 3 - Condições do HPLC para a análise das catecolaminas urinárias.....	31
Tabela 4 - Limites máximo e mínimo para o Controlo Interno.....	32
Tabela 5 - Exemplo dos resultados da análise da solução calibrador para a determinação das curvas de calibração das catecolaminas (NA, ADR e DA).....	39
Tabela 6 - Resultados da amostra de urina da figura 22.....	40
Tabela 7 - Valores de referência para as catecolaminas na urina de 24h.....	41
Tabela 8 - Exemplo de cálculos da <i>performance</i> cromatográfica para uma amostra.....	41
Tabela 9 - Comparação dos resultados do Controlo Externo – RIQAS.....	42
Tabela 10 - Resultados obtidos e sua análise estatística .....	43
Tabela 11 - Valores de referência para as catecolaminas fraccionadas.....	46
Tabela 12 - Valores de referência para as catecolaminas totais.....	46
Tabela 13 - Resultados do coeficiente de variação para catecolaminas totais.....	47
Tabela 14 - Resultados obtidos para amostras congeladas vs refrigeradas.....	48
Tabela 15 - Coeficiente de variação para catecolaminas totais nas amostras de urina.....	48
Tabela 16 - Resultados das amostras congeladas e refrigeradas de Controlo Externo – RIQAS.....	54
Tabela 17 - Resultados para a amostra refrigerada .....	55
Tabela 18 - Coeficiente de variação para catecolaminas totais nas amostras de RIQAS.....	56



## Lista de abreviaturas e siglas

ADR – Adrenalina

ATP – Adenosina Trifosfato

CG – Cromatografia Gasosa

COMT – Catecolamina-O-Metiltransferase

CV – Coeficiente de Variação

CVs – Coeficientes de Variação

DA – Dopamina

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

FN – Fase Normal

FR – Fase Reversa

GC – Cromatografia Gasosa

H – Altura Equivalente de um Prato

HVA – Ácido Homovanílico

HPCL – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

K – Factor de Retenção

L – Comprimento da Coluna

MAO – Monoamina Oxidase

N – Número de Pratos

NA – Noradrenalina

$R_s$  – Resolução

s – Desvio Padrão

$s^2$  – Variância

SPE – Extracção em Fase Sólida (*solid-phase extraction*)

$t_0$  ou  $t_M$  – Tempo Morto da Coluna

TH – Enzima Limitante da Síntese de Catecolaminas

$t_r$  – Tempo de Retenção

VMA – Ácido Vanilmandélico

W – Largura da Banda do Pico

$W_{1/2}$  - Largura do Pico a Meia Altura

$\alpha$  – Factor de Separação

# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento e Objectivos do Trabalho

O presente trabalho foi realizado sob orientação da Doutora Dina M. R. Mateus e do Engenheiro Roque do Laboratório Fernanda Galo Lda, na modalidade de estágio, e faz parte integrante do ciclo de estudos conducente ao grau de Mestre em Tecnologia Química, atribuído pela Escola Superior de Tecnologia de Tomar, do Instituto Politécnico de Tomar. O estágio decorreu de Fevereiro a Julho de 2014.

As catecolaminas são um grupo de amins biogénicas (noradrenalina, adrenalina, dopamina) que actuam como hormonas e neurotransmissores respectivamente. Actuam tanto ao nível da musculatura cardíaca, como no metabolismo e também na circulação periférica. Ao realizar uma análise bioquímica à urina para avaliar estas hormonas, e quando a sua concentração varia, há vários diagnósticos possíveis que vão desde hipertensões, doenças degenerativas ou neoplasias no sistema cromafim (feocromocitoma, neuroblastoma, paraganglioma).

Neste trabalho procedeu-se ao estudo do efeito da temperatura e do tempo de armazenagem na estabilidade de amostras (urina e controlos), nomeadamente no que diz respeito às catecolaminas urinárias. Efectuou-se a determinação destas por cromatografia de alta pressão (HPLC), em amostras congeladas e refrigeradas, durante aproximadamente um mês, sujeitas a sucessivas operações de congelação/descongelação.

O estudo da estabilidade das amostras de urina é bastante importante para a definição do prazo adequado para a realização do exame e do prazo máximo para a sua repetição, quando necessário. Não se encontraram na literatura estudos específicos sobre este assunto.

## 1.2. Caracterização da Empresa

O Fernanda Galo Laboratórios Lda, ilustrado na figura 1, fundado em 1958 pela Dra. Fernanda Galo, é um avançado e reconhecido conjunto de laboratórios, que primam pela qualidade e rigor das suas análises clínicas e ambientais.

Em 1993, a Dra. Conceição Faustino assumiu a Direcção Técnica e Gerência, dando início a um processo de desenvolvimento sustentado, com ampliação da área de actuação e actualização tecnológica.



Figura 1 - Laboratório de Análises Clínicas Fernanda Galo.

Este laboratório, aposta fortemente na inovação tecnológica e científica, nos mais avançados equipamentos, na qualificação e formação da sua equipa e na oferta diversificada de serviços de qualidade, seguindo os seguintes patamares:

**Objectivo:** Tornar o laboratório Fernanda Galo numa referência da Região Centro para as áreas de trabalho de Diagnóstico Clínico, Qualidade Ambiental e Segurança Alimentar.

**Missão:** Prestação de serviços analíticos de elevada qualidade nas áreas de trabalho.

**Visão:** Reconhecimento como um dos melhores e mais credíveis Laboratórios de Portugal, apostando no reconhecimento externo dos seus serviços e satisfação dos utentes e clínicos. Por outro lado, almeja alcançar, através de um permanente espírito de inovação e melhoria, a solidez financeira, garantindo a viabilidade económica da empresa e preparando-a para novos desafios que se perspectivem no futuro.

**Política de Qualidade:** Garantir a qualidade dos seus processos, a competência técnica dos seus profissionais e a actualização constante das suas metodologias, fomentando igualmente a qualidade do serviço e os níveis de satisfação dos seus utentes e clínicos.

O reconhecimento do prestígio do Fernanda Galo Laboratórios é comprovado pelos longos anos de experiência e pelo crescimento e evolução que tem alcançado, sendo acreditado pela Norma NP/EC IEC 17025 e tendo sido o primeiro laboratório em Portugal acreditado pela Norma NP/EC IEC 15189. Para além disso, possui diversos trabalhos científicos de relevo publicados.



## 2. Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

### 2.1. Aminas Biogénicas

As aminas biogénicas são um grupo de compostos biologicamente activos comumente encontrados na natureza. O termo “amina” é utilizado para compostos azotados básicos de baixo peso molecular, por outro lado “biogénico” refere-se a tudo aquilo que pode ser produzido no metabolismo dos organismos vivos animais ou vegetais.

Estas substâncias são formadas principalmente pela descarboxilação dos correspondentes aminoácidos precursores (García-Ruiz *et al.*, 2011).

Nos seres humanos, estas aminas actuam como neurotransmissores, sendo que cada amina está relacionada com diferentes respostas fisiológicas. Elas podem interferir no metabolismo e actuar em funções críticas do corpo humano, tais como a actividade cerebral, regulação da temperatura do corpo e da secreção gástrica, influenciar a resposta imune, crescimento e diferenciação celular (Ladero *et al.*, 2010).

Assim, surgiu a necessidade destes neurotransmissores serem frequentemente quantificados e estudados.

A seguir são apresentadas as principais características das aminas que foram estudadas neste trabalho.

#### 2.1.1. Catecolaminas

Catecolamina é o nome dado ao grupo de aminas biogénicas (noradrenalina, adrenalina e dopamina) que actuam como hormonas e neurotransmissores. A adrenalina (ADR) e noradrenalina (NA) são formadas a partir da dopamina (DA).

Estas moléculas têm uma acção fundamental, ao nível fisiológico, na condução e efectivação de estímulos neurológicos e neuromotores, como por exemplo, actividade física, stress psicológico ou choque hipovolémico (Silva, 2006).

Um aumento na produção de catecolaminas pode ser encontrado nos tumores do sistema cromafim (feocromocitoma, neuroblastoma, ganglioneuroma). Nos casos de

hipertensão, doença degenerativa cardíaca, esquizofrenia e psicose maníaco-depressiva, as concentrações das catecolaminas também podem variar (Silva, 2006).

### 2.1.2. Fisiologia da Glândula Supra-Renal

A glândula supra-renal tem uma dimensão reduzida, muito vascularizada, situada bilateralmente, na parte superior dos rins. É composta pelo córtex que ocupa 80 a 90% do seu volume, com cor amarelada devido ao elevado teor em lípidos e pela medula, de cor vermelho acastanhada, ilustrada na figura 2. Embora sejam independentes quanto à sua origem e estrutura, estão em estreita correlação funcional, o córtex deriva da mesoderme e a medula tem origem no tecido nervoso (ectoderme) (Cortes, 2010).

Esta glândula pode assim, ser subdividida no córtex, que secreta glicorticóides e mineracorticóides, e medula, cujo principal produto de secreção é a ADR, cerca de 80% (Brandan, 2010).

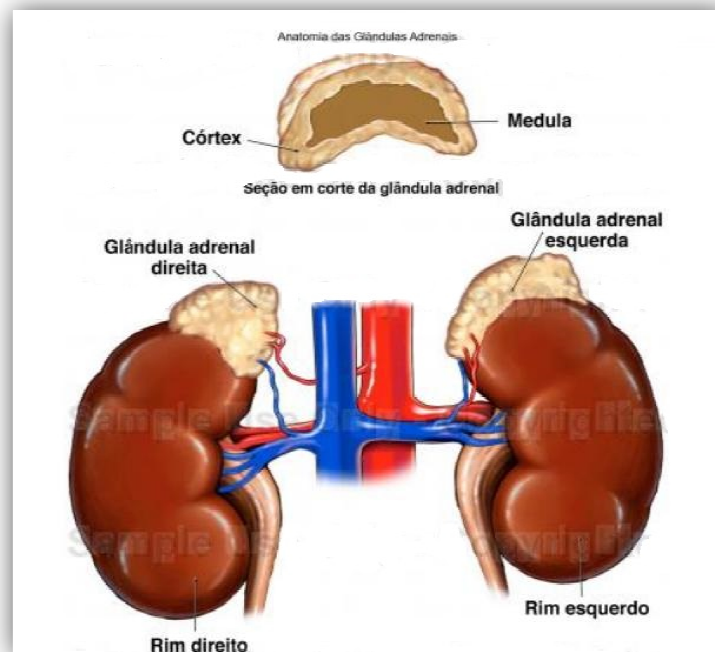


Figura 2 - Glândulas supra-renais (Oliveira e Rosa, nd).

A medula da supra-renal é formada por células chamadas de cromafins ou feocromócitos pelo facto de serem coradas pelo ácido crómico. Essas células sintetizam as

catecolaminas ADR e NA, sob a acção tónica das fibras colinérgicas do sistema simpático (De Nicola, 2003). Outra catecolamina também produzida é a DA, porém em concentrações bem menores, e apresenta funções basicamente vasomotoras, diferentemente das demais que possuem carácter metabólico (Cortes, 2010), sendo que no sistema nervoso central esta veio a revelar-se um neurotransmissor fundamental (Silva, 2006).

O sistema simpático e a medula da supra-renal formam uma unidade anatomofisiológica denominada sistema simpático-adrenal, ilustrada na figura 3. Tractos provenientes da ponte, do bulbo e do hipotálamo fazem sinapse com os neurónios simpáticos da medula espinal localizados na coluna intermediária. Os axónios desses neurónios pré-ganglionares podem passar através dos gânglios simpáticos para formar os nervos esplâncnicos que inervam a medula supra-renal. O seu principal neurotransmissor é a acetilcolina que excita as células cromafins ligando-se a receptores nicotínicos (De Nicola, 2003), levando à libertação das catecolaminas.

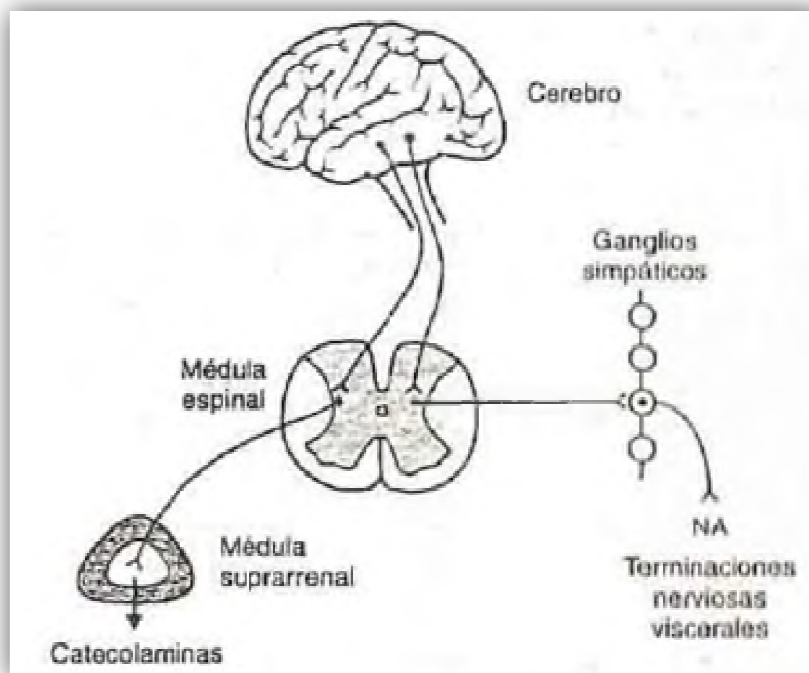


Figura 3 - Representação esquemática do sistema simpático-adrenal (De Nicola, 2003).

### 2.1.3. Biossíntese das Catecolaminas

A biossíntese das catecolaminas na glândula supra-renal ocorre a partir do aminoácido tirosina, que circula no sangue e pode ser captado pela medula da supra-renal (Fitzgerald, 2011), sendo assim obtido directamente a partir da dieta (fonte exógena) ou pode ser sintetizada no fígado (origem endógena) a partir do aminoácido fenilalanina (Brandan, *et al.*, 2010).

A tirosina é convertida em DOPA pela enzima TH (enzima limitante da síntese de catecolaminas), a qual usa como co-factor a tetraidroxibiopterina (pteridina reduzida). A DOPA é convertida, por sua vez, em DA pela DOPA descarboxilase (a qual é uma descarboxilase que actua sobre aminoácidos aromáticos), e assim, é formada a NA pela enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase. Finalmente a molécula de NA é metilada a ADR através da feniletanolamina *N*-metiltransferase, como ilustra a figura 4 (Fitzgerald, 2011).

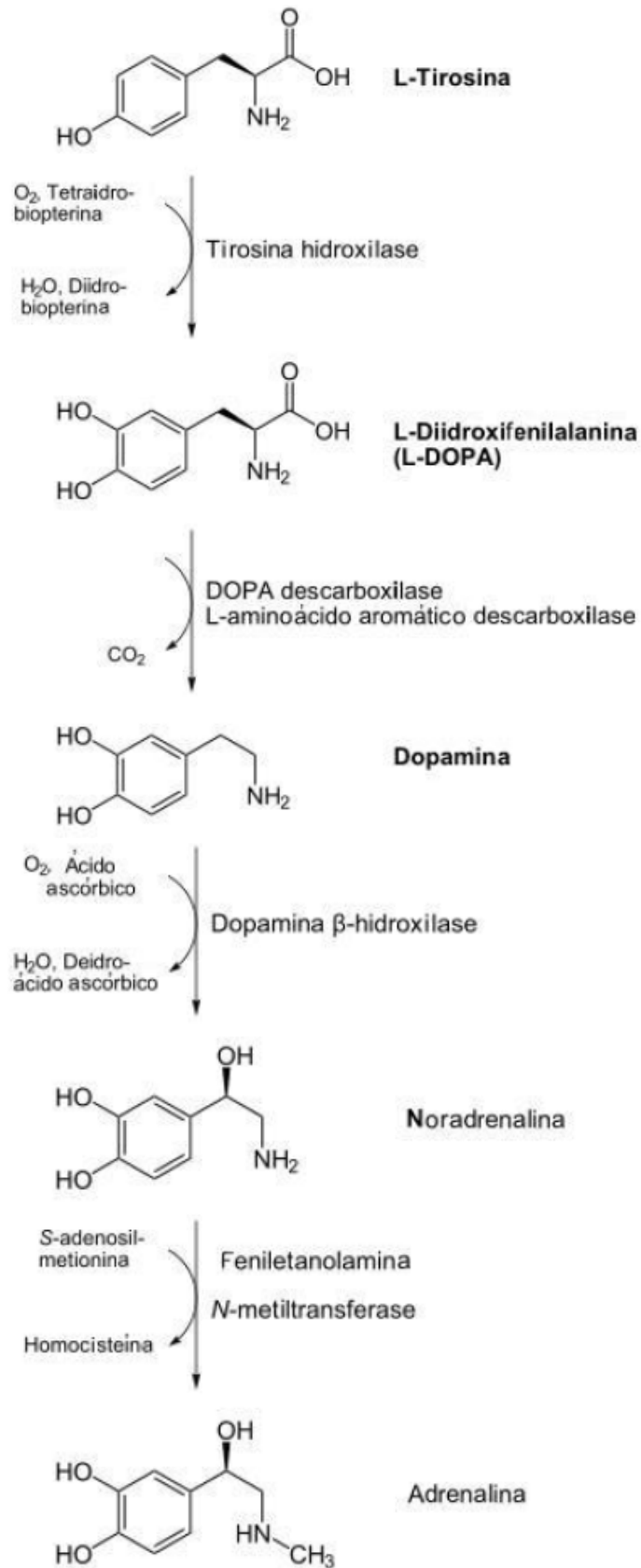


Figura 4 - Síntese das catecolaminas a partir do aminoácido tirosina (Fitzgerald, 2011).

A regulação desta biossíntese dá-se sobre dois sítios. O primeiro encontra-se na TH, enzima que é regulada por dois mecanismos: a DA, NA e ADR inibem-na, inibindo competitivamente o seu co-factor, o que possibilita que o excesso de catecolaminas possa inibir a sua própria síntese (Fitzgerald, 2011).

O outro estímulo, o qual também é regulatório, consiste na indução da síntese desta enzima, após o aumento da actividade granular, mediante estimulação dos nervos esplâncnicos (De Nicola, 2003).

As catecolaminas acumulam-se nas vesículas citoplasmáticas chamadas de grânulos de depósito. No interior desses grânulos, elas permanecem ligadas à adenosina trifosfato (ATP), o que impede a sua degradação pela enzima monoamina oxidase (MAO) (De Nicola, 2003). Já a libertação destes compostos derivados de aminoácidos ocorre através do mecanismo da exocitose (Brandan *et al.*, 2010), pela estimulação esplâncnica, que liberta a acetilcolina nos terminais nervosos das células nervosas das células cromafins (De Nicola, 2013).

Normalmente, apenas uma pequena fracção das catecolaminas libertadas entra no sangue (Brandan *et al.*, 2010).

A inactivação destas ocorre principalmente através da degradação. A degradação ocorre pela oxidação e metilação a cargo de duas enzimas, MAO e a catecolamina-O-metiltransferase (COMT), respectivamente. A MAO tem uma distribuição difusa, particularmente nos terminais pré-sinápticos noradrenérgicos. A COMT tem também uma distribuição difusa, particularmente no fígado, rins e músculo liso. Da acção destas enzimas resulta a libertação dos metabolitos das catecolaminas (Soares, 2006).

O ácido vanilmandélico (VMA) é o principal metabolito das catecolaminas NA e ADR, e o ácido homovanílico (HVA) é o maior metabolito da DA.

#### 2.1.4. Importância das Catecolaminas

A análise às catecolaminas e aos seus metabolitos é uma importante forma de diagnóstico de neoplasias do sistema simpático-adrenal (feocromocitoma, neuroblastoma e paraganglioma). Estes tumores são responsáveis pela elevação das catecolaminas aquando da sua biossíntese e excreção.

O padrão destas catecolaminas difere segundo a forma de tumor: feocromocitomas geralmente produzem NA e ADR; paragangliomas segregam NA e neuroblastomas produzem DA.

Valores aumentados das catecolaminas e seus metabolitos podem não só indicar vários tipos de neoplasias, mas também podem ser apenas casos de consumo excessivo de café, ou tabaco, uma situação de stress severo, hipoglicemia ou o uso de certos medicamentos (metildopa, isoproterenol, minoxidil, hidralazina). Por outro lado se os valores estiverem diminuídos pode sugerir hipotensão postural, síndrome Shy-Drager e disautonomia familiar.

Os feocromocitomas representam cerca de 95% das neoplasias de células cromafins, que ocorrem na medula da glândula supra-renal. No entanto existem células cromafins noutras localizações, nomeadamente nos gânglios simpáticos do sistema nervoso autónomo, que podem originar neoplasias, genética e funcionalmente relacionados com o feocromocitoma, designadas de paragangliomas (Costa, 2008).

Os neuroblastomas são neoplasias sólidas, provenientes do sistema nervoso simpático, virtualmente exclusivos da infância. Apesar dos grandes avanços terapêuticos e das técnicas de diagnóstico, estes ainda persistem como um grande desafio para os oncologistas pediátricos (Cartum, 2010).

Além disso, a DA também é responsável pelo controlo e regulação dos movimentos, estando assim associada a alterações do sistema dopaminérgico, como a doença de Parkinson, que está associada a um défice de DA e a esquizofrenia a uma hiperactividade do sistema dopaminérgico (Soares, 2006).

## 2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Devido à facilidade em efectuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (Rutz, 2009).

Sendo a cromatografia um método físico-químico, ela fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações

entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa que tem uma grande área superficial chamada fase estacionária (FE), e a outra um fluido que se move através da fase estacionária sendo chamada de fase móvel (FM) (Lanças, 1993; Degani *et al.*, 1998).

Assim, os componentes da amostra percorrem um meio adequado com o qual interactivam fisicamente (FE) arrastados por um fluido adequado (FM). A separação resulta na diferença das velocidades dos componentes arrastados pelo solvente, dependendo das diferentes interações (cargas, tamanhos moleculares, polaridades, afinidades específicas ou solubilidades) com a FE. As diferentes interações entre cada um dos analitos (substâncias que são separadas durante a cromatografia), e as duas fases resultam em diferentes velocidades no percurso (tempo de retenção), emergindo do meio a tempos diferentes (Ferro, 2010).

Hoje em dia a aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em vários laboratórios, é considerada indispensável, pois esta faz parte das técnicas de separação mais avançadas. Na HPLC, utilizam-se equipamentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados, tornando as análises mais rápidas, sem o comprometimento do desempenho cromatográfico (Maldener, 2009).

Os princípios teóricos fundamentais da HPLC foram estabelecidos na década de 1960, e desde aí, o desenvolvimento desta tem sido fenomenal (Raghavan, 2007). As razões para este crescimento estão relacionadas com a sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade (Tonhi, *et al.*, 2001). Além disso deu-se um grande desenvolvimento de novas partículas de FE, capazes de produzir colunas mais selectivas, eficientes e química e mecanicamente estáveis (Maldener, 2009). Assim, devido a este grande desenvolvimento esta técnica permitiu a injeção de volumes de amostra cada vez mais pequenos e reprodutíveis e a detecção de quantidades de analito cada vez menores, em sistemas de detecção com fluxo que indicam quando os componentes sofrem eluição da coluna (Gomes, 2010).

O princípio de análise para HPLC consiste na dissolução da amostra num solvente e de seguida, introduzi-lo na coluna cromatográfica preenchida com a FE. Simultaneamente, esse solvente (FM) é bombeado com fluxo constante, a alta pressão deslocando os componentes da mistura através da coluna. Estes distribuem-se entre as duas fases de acordo com as suas afinidades. As substâncias com maior afinidade com a FE movem-se mais lentamente. Já as substâncias com pouca afinidade com a FE movem-se mais

rapidamente. Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal eléctrico o qual é registado, originando um cromatograma, como se pode verificar na figura 5 (Argenton, 2010). Portanto, um cromatograma é a resposta do detector na forma de um gráfico, representando a concentração de analito no efluente, em função do tempo ou do volume de eluição (Gomes, 2010; Pombeiro, 2003). A área dos picos do cromatograma é proporcional à concentração de analito, sendo essa proporcionalidade determinada com base na inserção de padrões de concentração conhecida.

O processo de escoamento dos compostos, que são arrastados pela FM ao longo da coluna até à saída, designa-se por eluição (Pombeiro, 2003).

Os equipamentos de HPLC possuem *software* próprio que determina a área dos picos do cromatograma por integração permitindo ainda a calibração automática.

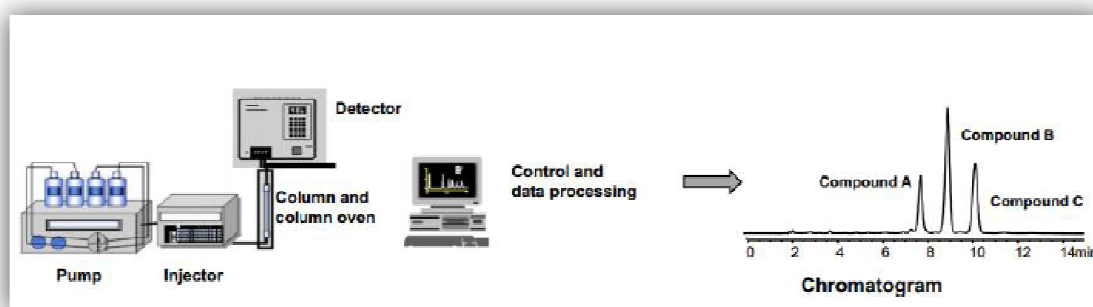


Figura 5 - Sistema de HPLC.

Esta técnica veio complementar a cromatografia gasosa (GC) no tipo de compostos que podem ser separados, pois a HPLC é utilizada em análises de compostos não voláteis ou termicamente instáveis, onde a CG não pode ser utilizada. Como cerca de 80% dos compostos apresentam essas características, o campo de aplicação da HPLC é extremamente vasto (Argenton, 2010).

Além disso, na HPLC utiliza-se uma menor quantidade de FM, o que permite utilizar solventes raros, ou caros, além de que os tempos de retenção são mais curtos e esta permite realizar um maior número de análises por unidade de tempo.

Assim, esta técnica apresenta inúmeras vantagens das quais se destacam (Bottoli, 2007):

- versatilidade, único requisito é a solubilidade da amostra na FM;

- tempo reduzido de análise;
- alta resolução;
- boa reprodutibilidade;
- possível automação.

Mas também lhe são apontadas algumas desvantagens (Bottoli, 2007):

- elevado custo do equipamento e da sua manutenção;
- não existe um detector universal com boa detectabilidade e baixo custo;
- experiência do operador no seu manuseamento.

A HPLC pode ser dividida em dois grupos principais, cromatografia de fase normal (FN) e de fase reversa (FR), de acordo com a natureza da FM e FE. Na tabela 1, constam as suas principais diferenças.

Tabela 1 – Características de cromatografia de FN e FR (Raghavan, 2007; Degani, *et al.*, 1998).

	<b>Cromatografia Fase Normal</b>	<b>Cromatografia Fase Reversa</b>
<b>Fase Estacionária</b>	Polar - sílica, vidro poroso ou alumina	Apolar - sílica
<b>Fase Móvel</b>	Apolar - hexano ou tetrahydrofurano	Polar - mistura de uma solução aquosa e um solvente orgânico (metanol e acetonitrilo)
<b>Eluição</b>	Solutos apolares são eluídos primeiro, os polares são retidos pela FE e eluídos depois	Compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente

A cromatografia de FR é bastante versátil, rápida e altamente reprodutível, sendo a sua eficiência dependente da polaridade, pH, solubilidade e das características físico-químicas do soluto (Raghavan, 2007). Portanto a maioria das separações efectuadas é de FR, tendo esta um maior campo de aplicação que a de FN (Gomes, 2010).

Na cromatografia de FR existe uma relação exponencial entre o factor de retenção, e a fracção do volume do solvente orgânico na FM. Um erro de 1% na quantidade de solvente orgânico pode fazer variar o tempo de retenção entre 5% e 15% (Gomes, 2010).

Quando a composição da FM é alterada gradualmente ao longo da eluição cromatográfica, estamos perante uma eluição de gradiente. Nos casos em que a composição da FM se mantém constante durante toda a análise, o tipo de eluição é conhecida como isocrática (Pombeiro, 2003).

### 2.2.1. *Performance* Cromatográfica

Para os métodos cromatográficos, os critérios considerados para a definição da *performance* esperada têm como base o referencial normativo ISO 13530 (ISSO/TS13530 2009) e o guia CITAC/EURACHEM (EURACHEM 1998).

A eficiência da separação é avaliada cromatograficamente a partir da determinação dos seguintes parâmetros: factor de retenção (K), factor de separação ( $\alpha$ ), resolução ( $R_s$ ) e número de pratos (N). Estes parâmetros são otimizados a partir de estudos ao nível de:

- FE, utilizando diferentes colunas;
- FM, experimentando diferentes eluentes e diferentes proporções no caso de misturas, desde que compatíveis com a FE (Sarah, 2005; Ferreira, 2012).

Na figura 6 são indicados os parâmetros utilizados para o cálculo dos valores de *performance* cromatográfica, acima mencionados.

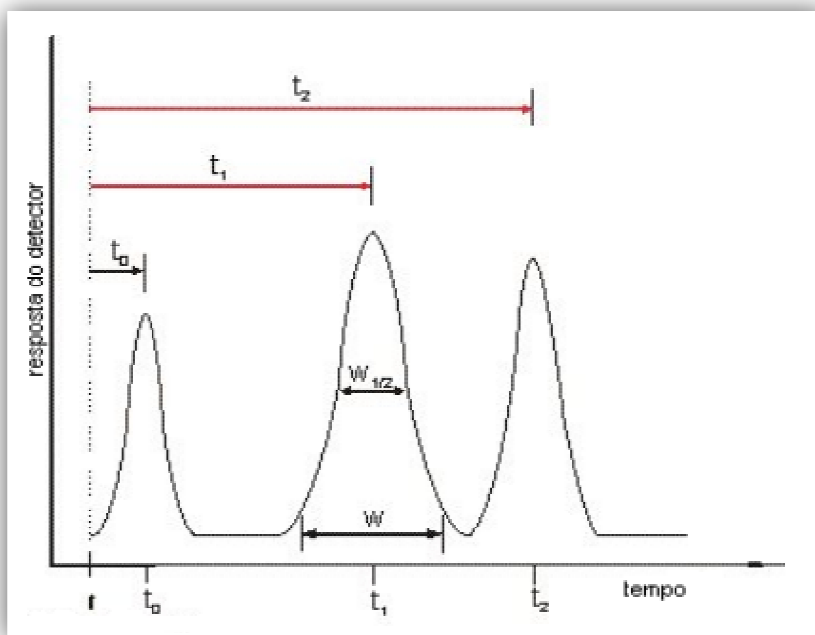


Figura 6 - Cromatograma com identificação dos parâmetros para calcular *performance* (Gomes, 2010).

Onde:

**$t_0$  ou  $t_M$**  (tempo morto da coluna): também conhecido como o tempo extra da coluna, é o tempo que demora um soluto que não foi retido na coluna para ser eluído, isto é, um composto que é insolúvel ou não é adsorvido na FE.

**W**: largura da banda do pico, resultante da intersecção das duas tangentes aos pontos de inflexão do pico.

**$W_{1/2}$** : largura do pico a meia altura.

**$t_r$**  (tempo de retenção): é o tempo que demora um soluto a ser totalmente eluído da coluna. Este corresponde à medida de tempo, normalmente em minutos, que o analito leva a percorrer o sistema cromatográfico. O tempo de permanência efectivo do analito no sistema cromatográfico, nomeadamente na FE, é determinado a partir da seguinte relação expressa na equação 1 (Ferreira, 2012).

$$t'_r = t_r - t_M \quad (1)$$

A seguir, descrevem-se os parâmetros de *performance*.

### **Factor de retenção (K)**

O factor de retenção também conhecido por factor de capacidade é uma medida de distribuição da amostra entre a FM e a FE, ou seja mede o tempo em que um analito é retido pelas partículas da coluna em relação ao tempo percorrido na FE, segundo a equação 2.

$$K = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} = \frac{t'_r}{t_0} \quad (2)$$

Este valor é específico para cada substância dependendo das fases móvel e estacionária, da temperatura e da qualidade de enchimento da coluna. Quanto maior for este valor melhor será a retenção ao soluto.

O ideal seria todos os picos eluírem com um valor de K entre 2 e 10, de forma a obter uma melhor *performance* cromatográfica. Contudo, para as amostras mais complexas podem ser aceites valores entre 1 e 20 (Ferro, 2010).

Valores menores que 2 indicam pouca interacção entre o soluto e a FE, enquanto valores maiores que 10 indicam interacção muito forte com a FE, resultando em análises demoradas (Synder, 1996).

### **Factor de separação ( $\alpha$ )**

O factor de separação também designado como factor de retenção ou de selectividade é medido pelo tempo de retenção relativo de dois picos ( $t_{r1}$  e  $t_{r2}$ ) em relação ao  $t_0$ , segundo a equação 3.

$$\alpha = \frac{t_{r2}-t_0}{t_{r1}-t_0} \quad (3)$$

Quando  $\alpha$  é próximo de 1 a coluna não é selectiva, ou seja, não ocorreu separação (Ferro, 2010).

### **Resolução ( $R_s$ )**

É a medida que determina se dois picos adjacentes estão completamente separados, e é calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos, estimada a partir das larguras da base, ou a partir da largura da base a meia altura, como demonstra a equação 4.

$$R_s = \frac{2(t_2-t_1)}{W_2+W_1} \quad (4)$$

Quando  $R_s=1$ , os dois picos são razoavelmente separados, com apenas 2% de superposição das áreas, se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Valores de resolução superiores a 1 indicam uma melhor separação, sendo o valor óptimo para  $R_s > 1,5$  o que indica uma separação completa. Na prática, considera-se um pico com boa resolução a partir de  $R_s=1,25$ , como demonstra a figura 7 (Ferreira, 2012).

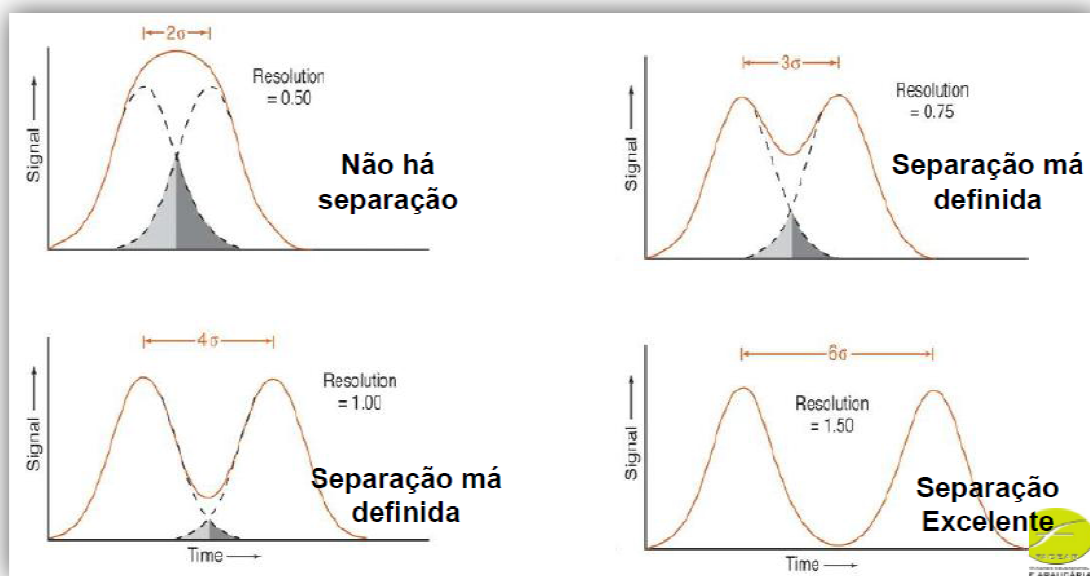


Figura 7 - Resolução num cromatograma (Adão, nd.).

### Número de pratos (N)

É o número indicativo da *performance* da coluna, sendo por isso adimensional. Corresponde à medida da largura do pico em relação ao seu  $t_r$  (Argenton, 2010). Este parâmetro está relacionado com a eficiência cromatográfica.

Um prato equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a FE e a FM. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, melhor a separação. Na prática, o número de pratos é a medida do alargamento do pico que ocorre quando o analito passa através do sistema e pode ser calculado pela equação 5.

$$N = 16 \times \left( \frac{t'_r}{W} \right)^2 \quad (5)$$

Qualitativamente, a eficiência pode ser avaliada pelo formato do pico cromatográfico, como mostra a figura 8. Quanto mais estreito for o pico, menor é a distribuição dos analitos na coluna, pelo que maior será a eficiência desta na separação do soluto (Gomes, 2009; Pombeiro, 2003).

A eficiência pode ser influenciada por vários factores, nomeadamente as condições de análise (temperatura), o tamanho da amostra (volume de injeção), o tipo de soluto (pH) e, principalmente, o comprimento da coluna, sendo este último o componente que dificulta a

comparação de N entre colunas diferentes. Pelo que, a avaliação comparativa entre colunas é feita com base na altura equivalente a um prato (H), que corresponde à razão entre o comprimento da coluna (L), e N, eliminando a influência dos diferentes comprimentos da coluna (Paschoal *et al.*, 2008).

$$N = \frac{L}{H} \Leftrightarrow H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

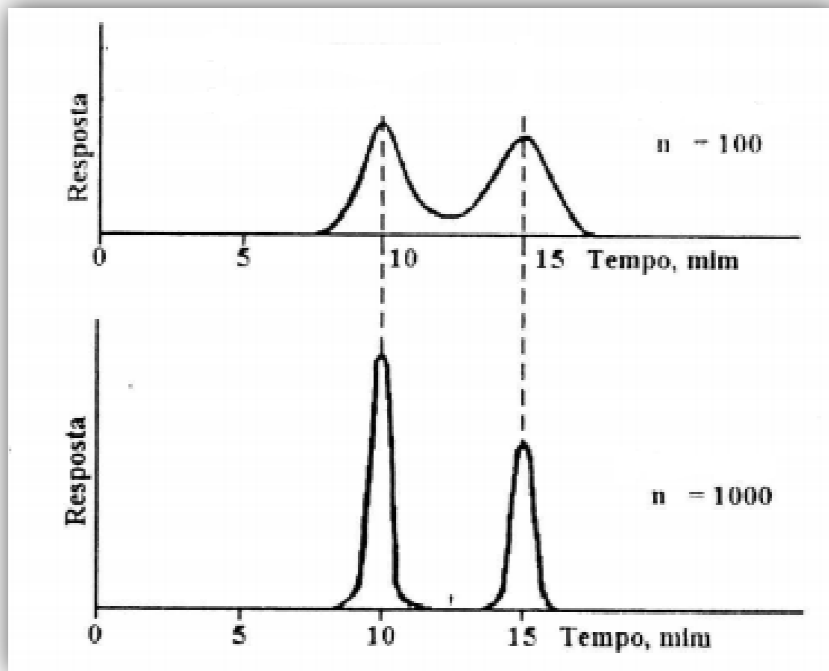


Figura 8 - Influência de N na resposta da coluna cromatográfica (Argenton, 2010).

### 2.2.2. Equipamento de HPLC

Na figura 9, encontra-se representado um esquema típico de HPLC, onde se pode identificar os vários componentes instrumentais e químicos.

Os componentes instrumentais são a bomba, o injetor, a coluna, o detector e o sistema de processamento de dados, enquanto os componentes químicos são a FM e FE (Ferro, 2010).

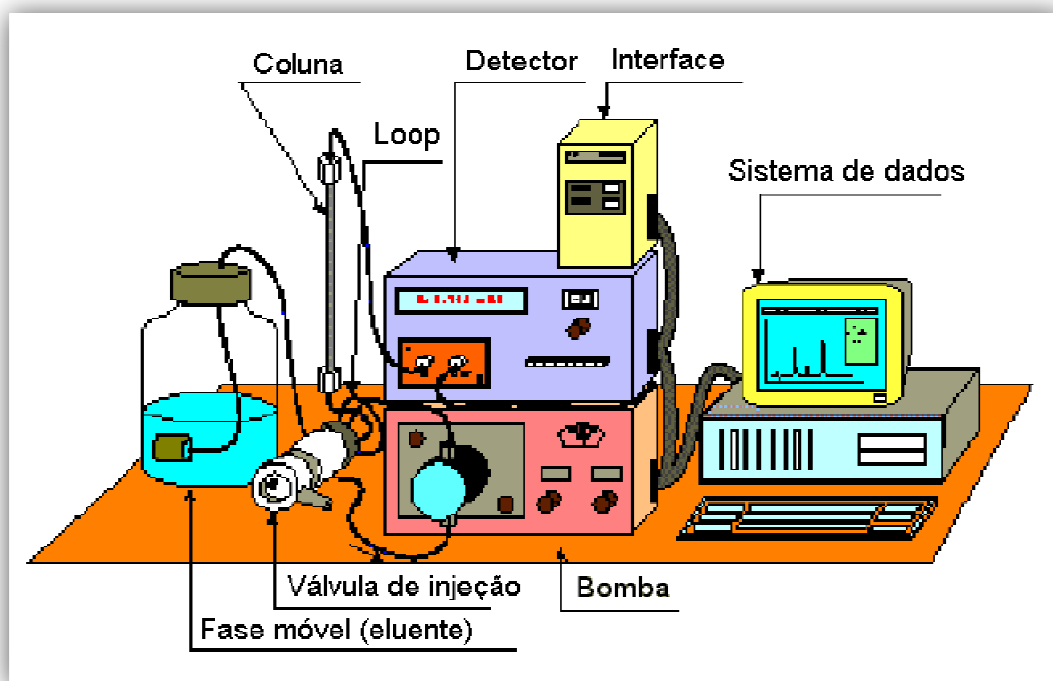


Figura 9 - Montagem típica de HPLC (Bottoli, 2007).

## Fase Móvel

A FM é um líquido que está continuamente a ser bombeado para a coluna e que actua, não só como transportador da amostra (Ferro, 2010), mas desempenha, igualmente, um papel importante no grau de separação que é possível atingir com uma determinada coluna. É a interacção química entre a FM e amostra com o enchimento da coluna que determina o grau de migração e separação dos componentes contidos na amostra, por isso o tipo e a composição da FM influencia a separação numa dada coluna (Ferro, 2010).

O sucesso da separação cromatográfica só é possível se for aplicada uma FM correcta a uma FE conveniente.

A escolha da composição da FM tem em conta vários factores, tais como:

- propriedades físico-químicas que afectam a solubilidade, partição e adsorção e, portanto, a separação;
- propriedades físicas que afectam tanto a possibilidade de detecção dos componentes, como as que dificultam o manuseamento das bombas, detector e coluna;

- propriedades que afectam a segurança (toxicidade e inflamabilidade);
- custo (Argenton, 2010).

O abastecimento da FM é equipado com um ou mais reservatórios que podem ser de vidro ou o próprio recipiente do solvente, desde que este seja inerte, ou de aço inoxidável, sendo que este não é apropriado para fases móveis tamponadas com pH baixo, pois poderá ocorrer a corrosão do recipiente.

Fases móveis como a água e outros solventes polares têm tendência a dissolver gases como o oxigénio e azoto. Se estes gases forem libertados dentro do equipamento podem formar bolhas na coluna e no sistema de detecção essas bolhas podem causar o espalhamento de banda, interferindo assim na eficiência do detector. Por este motivo os solventes devem ser desgaseificados, através de sistemas de bomba de vácuo, sistemas de destilação e dispositivos de aquecimento (Pombeiro, 2003).

Alguns sistemas contêm filtros a fim de impedir que a poeira e materiais particulados no solvente causem danos no sistema de bombeamento, de injeção e entupimento da coluna (Rutz, 2009).

### **Fase Estacionária**

A FE consiste em pequenas partículas porosas que aumentam a área superficial. Os principais parâmetros desta são: o tamanho da partícula, a distribuição do tamanho da partícula, o tamanho do poro, área de superfície, tipo e quantidade de ligantes.

A natureza das fases estacionárias é um importante parâmetro para determinar as propriedades dos sistemas de separação de FN ou FR (Ferro, 2010).

### **Bombas de Alta Pressão**

Devido ao facto de trabalhar com colunas de partículas com dimensões muito reduzidas, a HPLC necessita que o fluxo da FM seja constante e a alta pressão (até 6000kpsi), o que se consegue através de um sistema de bombeamento eficaz. A utilização da alta pressão é necessária, pois as partículas da FE exercem alta resistência ao fluxo da FM e se esta não fosse utilizada, a análise seria muito lenta (Argenton, 2010).

O fluxo deve ser constante para garantir a reprodutibilidade, sensibilidade e exactidão da análise (Rutz, 2009). Além disso, o bombeamento pode ser isocrático ou por gradiente, como já se referiu anteriormente. No caso de ser isocrático utiliza-se apenas uma bomba (Argenton, 2010).

Normalmente utilizam-se bombas recíprocas com um ou preferencialmente dois pistões o que minimiza a pulsação.

### Sistema de Injecção da Amostra

Para se obter uma boa eficiência nas análises cromatográficas, um factor muito importante a considerar é a maneira como se introduz a amostra na coluna.

O sistema de injeção mais utilizado, é o da válvula rotatória (utilizado no estudo), pois além de ser reprodutível, elimina o problema de retorno da amostra. Neste sistema o volume injectado não necessita de ser preciso, pois a válvula rotatória tem uma alça capilar amostradora (*loop*), ilustrado na figura 10, capaz de seleccionar volumes de 1 a 100  $\mu\text{L}$  de amostra, sendo o excesso levado para fora do equipamento (Rutz, 2009), para um esgoto, o que faz com que a introdução da amostra, figura 11, tenha grande precisão e exactidão de volume (Argenton, 2010).



Figura 10 - *Loop*.



Figura 11- Introdução da amostra no HPLC.

Na figura 12 pode ser visualizado o método de injeção da amostra, com a válvula rotatória no interior do *loop*. Na posição de carregar (a) um determinado volume de amostra é carregado, enquanto a FM vai directa para a coluna. A rotação da posição geralmente é feita manualmente. Assim na posição injectar (b), mudam-se as conexões, fazendo com que a FM passe pela alça de amostragem e arraste a amostra para a coluna (Rutz, 2009).

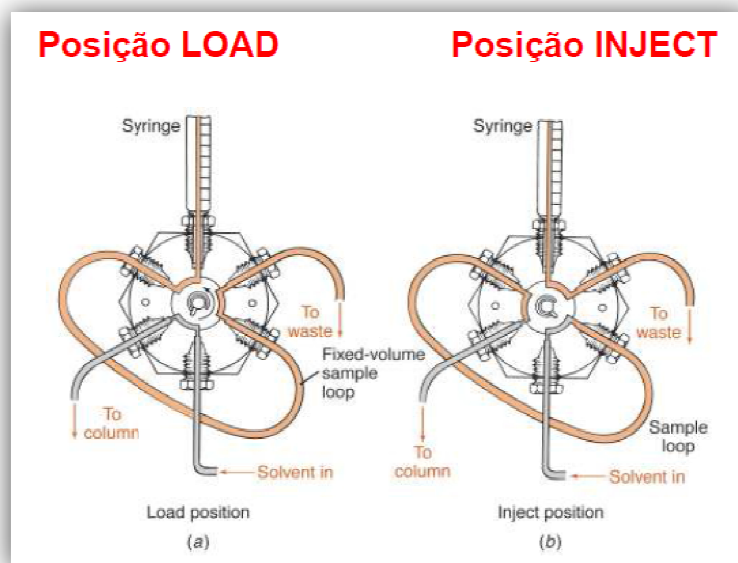


Figura 12 - Sistema de injeção da amostra com a válvula rotatória (Bottoli, 2007).

## Coluna

Num sistema de HPLC podem existir três tipos de colunas, as de saturação, de guarda e as analíticas. A que foi utilizada neste estudo, figura 13, era analítica. É nesta que se encontra a FE.



Figura 13 - Coluna utilizada no trabalho.

Normalmente, a coluna é constituída por aço inoxidável, mas também pode-se utilizar vidro reforçado e sílica fundida, desde que o material seja inerte, de modo a ser capaz de resistir às elevadas pressões, além de que o diâmetro deverá ser uniforme (Pombeiro, 2003).

As colunas mais utilizadas apresentam normalmente um diâmetro interno que varia entre 4-6mm e um comprimento que depende da granulometria da FE como mostra a tabela 2 (Argenton, 2010).

Tabela 2 - Características das colunas analíticas (Argenton, 2010).

Granulometria ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento (cm)
3 - 5	10 - 15
7 - 10	Até 25 cm (em casos especiais, até 60 cm)

## Detector

Os detectores são sensores com dispositivos electroquímicos, que detectam e enviam um sinal eléctrico a um processador (Raghavan, *et al.*, 2007). Esse sinal é registado na forma de um pico cuja área é proporcional à quantidade do componente analisado (Argenton, 2010).

Assim, um detector para HPLC deve ser caracterizado por dar uma resposta linear em função da concentração de soluto, numa grande gama de concentrações. Além disso, deve

ter uma elevada relação sinal/ruído (atendendo a que o ruído é devido a flutuações ou perturbações na temperatura, pressão ou alterações do fluxo da FM, podendo ser também devido ao circuito eléctrico do detector). Este ruído deve ser baixo para que baixas concentrações de soluto possam ser detectadas (Raghavan, *et al.*, 2007).

Neste estudo o detector utilizado foi o electroquímico, figura 14. Este tipo de detector baseia-se na possibilidade de muitos compostos serem oxidados ou reduzidos quando se aplica um potencial eléctrico (Argenton, 2010).

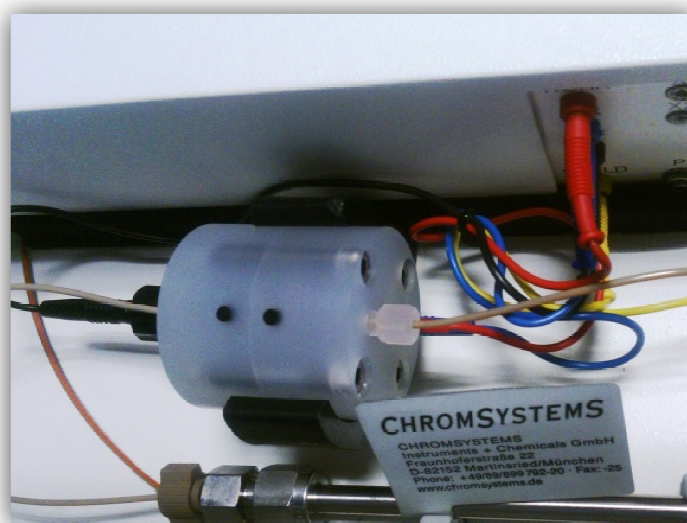


Figura 14 - Detector electroquímico.

## Processador de dados

O processador de dados estabelece a conexão entre os vários componentes de HPLC. Para isso é necessário um *software* adequado, neste caso foi utilizado o 32 Karat 7.0, que de modo a aumentar a versatilidade, exactidão e precisão permite controlar a composição da FM, o fluxo que sai da bomba, a injeção da amostra e a temperatura da coluna, podendo diagnosticar possíveis problemas que surjam (Rutz, 2009). Além disso processa os dados adquiridos pelo detector, apresentando-os na forma de um cromatograma (Ferro, 2010) efectuando a integração das áreas e mediante calibração relaciona-os directamente com a concentração dos analitos.



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Equipamentos e Materiais

O equipamento de cromatografia utilizado foi um HPLC *System Gold* da marca Beckman, figura 15, equipado com um sistema de bombas de modelo 126, ligado a um detector electroquímico 166, figura 16.



Figura 15 - Equipamento de HPLC.

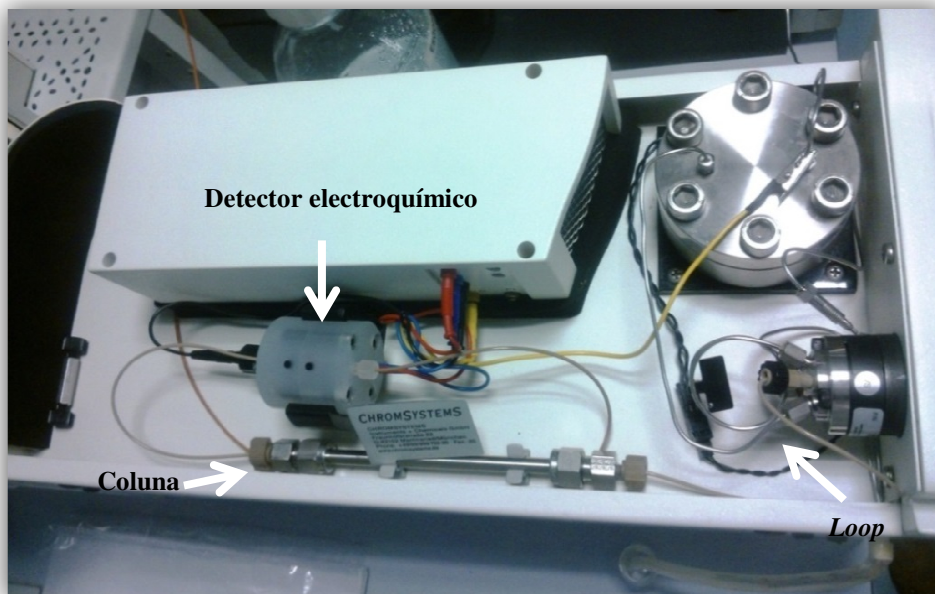


Figura 16 - Interior do detector.

O detector electroquímico utilizado era constituído por uma célula electroquímica VT-03. Esta célula é formada por um eléctrodo de carbono vítreo, utilizado como eléctrodo de trabalho, e um eléctrodo de referência *in-situ* Ag/AgCl, imerso numa solução de KCl saturada, contendo cristais de KCl e, ainda, um eléctrodo auxiliar de aço inoxidável.

A coluna utilizada era da marca Chromsystems Order to 6100. Nesta a FE é constituída por sílica-gel, sendo a cromatografia de FR.

Os equipamentos utilizados para auxiliar a preparação das amostras foram:

- agitador vortex (Heidolph, modelo Reax 2000);
- sistema de filtração com bomba de vácuo, que foi utilizado para aspirar as amostras no processo de preparação;
- centrifugadora (Jouan, modelo GR 4.12);
- colunas de preparação de amostras;
- fita de medição de pH;
- micropipetas de 10–5000  $\mu\text{L}$ ;
- pipetas de 10 mL;
- material corrente de laboratório.

Para introduzir a amostra na válvula de injeção, utilizou-se uma micro seringa de injeção de 25 µL.

As análises foram efectuadas pelo método do padrão interno.

Para tratamento dos resultados utilizou-se o *software* 32 Karat versão 7.

As seguintes soluções, e reagentes utilizados foram fornecidos pela empresa RECIPE, excepto o Controlo Externo – RIQAS, que foi fornecido pela RANDOX.

Soluções utilizadas:

- Standard - ClinTest®;
- Calibrador - ClinCal® (urina liofilizada);
- Controlo Interno - ClinChek® (urina liofilizada);
- Padrão Interno,
- Controlo Externo RIQAS - Programa de Urina Humana: RQ9115 (urina liofilizada com concentrações de catecolaminas desconhecidas).

Reagentes:

- Reagente E (eluição);
- Reagente S (estabilização).

Soluções preparadas no laboratório:

- Solução de HCl 0,2M, para preparar calibrador e controlo interno;
- Solução de NaOH 1M;
- Solução de KCl saturada.

## 3.2. Métodos Analíticos

### 3.2.1. Extração da Fase Sólida

A técnica de extração da fase sólida (SPE, do inglês: *solid-phase extraction*) é uma alternativa prática para a pré-concentração de amostras.

Basicamente, a SPE consiste em percolar uma amostra através de um adsorvente sólido de forma a que os analitos e interferentes que têm afinidade com a fase sólida fiquem retidos, enquanto os outros compostos passam sem serem retidos. Os analitos retidos são recuperados mediante eluição com um solvente adequado (Hennion, 1999).

Assim, esta técnica tem de forma simplificada quatro etapas básicas:

- A) condicionamento;
- B) aplicação da amostra;
- C) lavagem, que permite que algumas impurezas francamente retidas sejam eliminadas pela passagem de um solvente fraco (água);
- D) eluição.

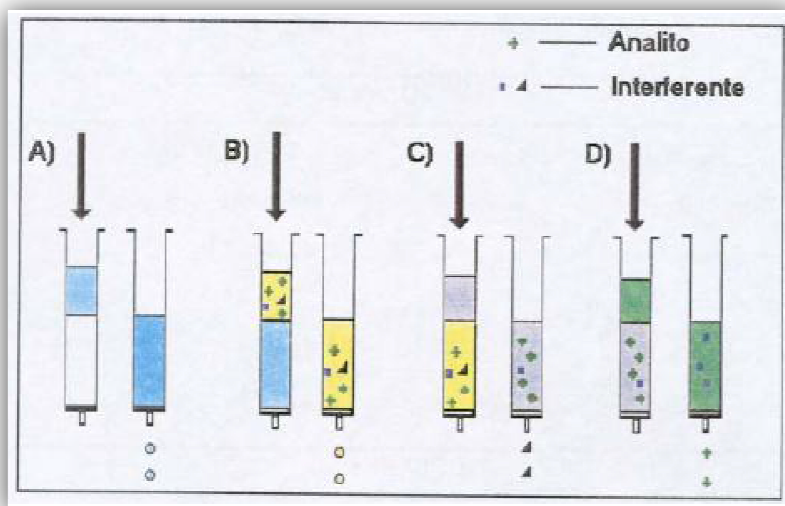


Figura 17 – Método de extração da fase sólida (Gomes, 2009).

### 3.2.2. Determinação de Catecolaminas

#### Condições Cromatográficas

A eluição foi realizada em modo isocrático da FM utilizando as condições referidas na tabela 3.

Tabela 3 - Condições do HPLC para a análise das catecolaminas urinárias.

<b>Injector</b>	Volume de injeção	20 $\mu$ L
	Fluxo	0,7 mL/min
	Intervalo de injeção	10 min
<b>Coluna</b>	Temperatura	30 °C
	Pressão	200 bar
	Pressão das Bombas	0,72 kpsi
<b>Detector</b>	Tipo	Electroquímico
	Vcell	500 mV
	Filtro	5 s
	Range	0,5 nA/V

#### Preparação de soluções

##### *Solução Padrão:*

É uma solução comercial que está pronta a ser injectada. O seu objectivo consiste em verificar se o equipamento está nas devidas condições, ou seja, se a coluna detecta os componentes e se estes são separados nos tempos correctos. O cromatograma obtido é comparado com o de referência, fornecido pela RECIPE, em termos dos tempos de retenção e do declive dos picos.

##### *Solução Calibrador:*

É uma solução que é utilizada com o objectivo de calibrar o sistema de HPLC para a análise das catecolaminas urinárias.

Ela é responsável pela obtenção das curvas de calibração, por isso o calibrador deve ser injectado várias vezes, até obter cromatogramas semelhantes, garantindo, assim, um bom resultado final.

A solução preparou-se adicionando ao frasco 8,0 mL de solução de HCl 0,2 M, e esperou-se cerca de 15 min até todo o material estar dissolvido. Depois desta primeira preparação, e antes de ser injectada no HPLC, a solução deve sofrer o mesmo tratamento que as amostras, descrito mais a frente neste trabalho.

#### *Solução Controlo Interno:*

O controlo interno é utilizado com o objectivo de assegurar a qualidade interna dos laboratórios de análises, garantindo a qualidade do processo, de modo a que os resultados sejam fidedignos. São acompanhados de uma tabela, tabela 4, fornecido pelo fabricante, com os valores limite de controlo.

Tabela 4 - Limites máximo e mínimo para o Controlo Interno.

<b>Analito</b>	<b>Valor Médio (µg/L)</b>	<b>Limites de Controlo (µg/L)</b>
<b>Noradrenalina</b>	164	131-197
<b>Adrenalina</b>	37,3	29,8-44,8
<b>Dopamina</b>	270	216-324

A solução de controlo preparou-se adicionando ao frasco, 8,0 mL da solução de HCl 0,2 M e agitou-se durante 15 minutos. Esta solução obtida, antes de ser injectada no HPLC, sofreu também o mesmo tratamento que as amostras.

#### *Controlo Externo – RIQAS:*

O controlo externo tem como objectivo a avaliação da qualidade dos resultados obtido por uma entidade externa independente.

Esta solução foi preparada hidratando o frasco do controlo externo com 10,0 mL de água destilada. Esperou-se 30 min e adicionaram-se 3 gotas da solução de ácido clorídrico, que é fornecida conjuntamente com o controlo externo. Seguidamente foi preparada de

acordo com o mesmo método analítico que as amostras e, por fim, injectada no equipamento.

**Preparação das amostras** (calibrador, controlos e urina a analisar):

- i) Colocou-se 3,0 mL de urina, previamente centrifugada e acidificada com HCl, em 3 tubos de ensaio;
- ii) A cada tudo adicionou-se 5,0 mL do Reagente S e 30 µL do Padrão Interno;
- iii) Agitou-se suavemente e verificou-se a cor das amostras (pH). Caso se verifica-se que a cor era laranja, adicionava-se NaOH até passar a amarela;
- iv) Adicionaram-se as amostras à coluna de extracção, sendo o filtrado obtido desprezado;
- v) Encheram-se as colunas até ao topo com a solução de água de HPLC, filtrou-se e desprezou-se o filtrado;
- vi) Adicionou-se a cada coluna 6,0 mL do Reagente E, filtrou-se e recolheu-se o filtrado;
- vii) Os tubos foram agitados por breves instantes, num agitador de vórtice, a fim de homogeneizar a amostra;
- viii) De seguida as amostras foram injectadas no HPLC.

Sempre que se efectuaram análises injectou-se primeiro a solução padrão, repetiu-se este procedimento até à obtenção de dois cromatogramas idênticos ao cromatograma de referência. Procedeu-se posteriormente à injeção da solução de calibração, seguida da injeção do controlo interno. Finalmente injectaram-se as amostras a analisar.

### 3.3. Controlo Externo – RIQAS (Avaliação Externa)

De modo a avaliar externamente a qualidade do método analítico utilizado neste estudo, procedeu-se à análise de um Controlo Externo - RIQAS. Este foi hidratado tal como referido no ponto 3.2.2. e, após análise, enviou-se os resultados para um laboratório

externo (laboratório avaliador), que comparou os valores obtidos com os valores de referência, que neste caso são os reais.

O RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*) foi criado em 1990, e desde então tornou-se um dos maiores esquemas de avaliação de qualidade externa a nível global. Actualmente é constituído por um total de 21 programas, abrangendo uma ampla gama de testes de diagnóstico. O principal objectivo deste é ajudar os laboratórios a satisfazer as suas exigências de qualidade e, mais importante fornecer o melhor cuidado possível ao paciente.

### 3.4. Estudo da Estabilidade das Catecolaminas

Para a realização deste estudo, utilizaram-se amostras que foram apenas congeladas ou refrigeradas e algumas amostras foram simultaneamente refrigeradas e congeladas, de modo a avaliar a sua estabilidade ao longo de várias semanas.

#### 3.4.1. Amostras Congeladas

Para estudar o efeito da congelação utilizaram-se amostras de um Controlo Interno, com 8,0 mL e dois Controlos Externos – RIQAS, com as referências 43 12 e 42 3, de 10,0 mL cada. Estes foram hidratados como referido no ponto 3.2.2., e posteriormente realizou-se a sua extracção, sendo de seguida analisados no HPLC. Os respectivos frascos e alíquotas de cada extracção foram congelados a cerca de  $-15 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , sendo depois descongelados a  $25^{\circ}\text{C}$ , temperatura ambiente, e congelados sucessivamente para se proceder à sua reanálise.

Estas análises foram repetidas durante 33 dias, com intervalos de 6-7 dias, de acordo com o esquema apresentado na figura 18.

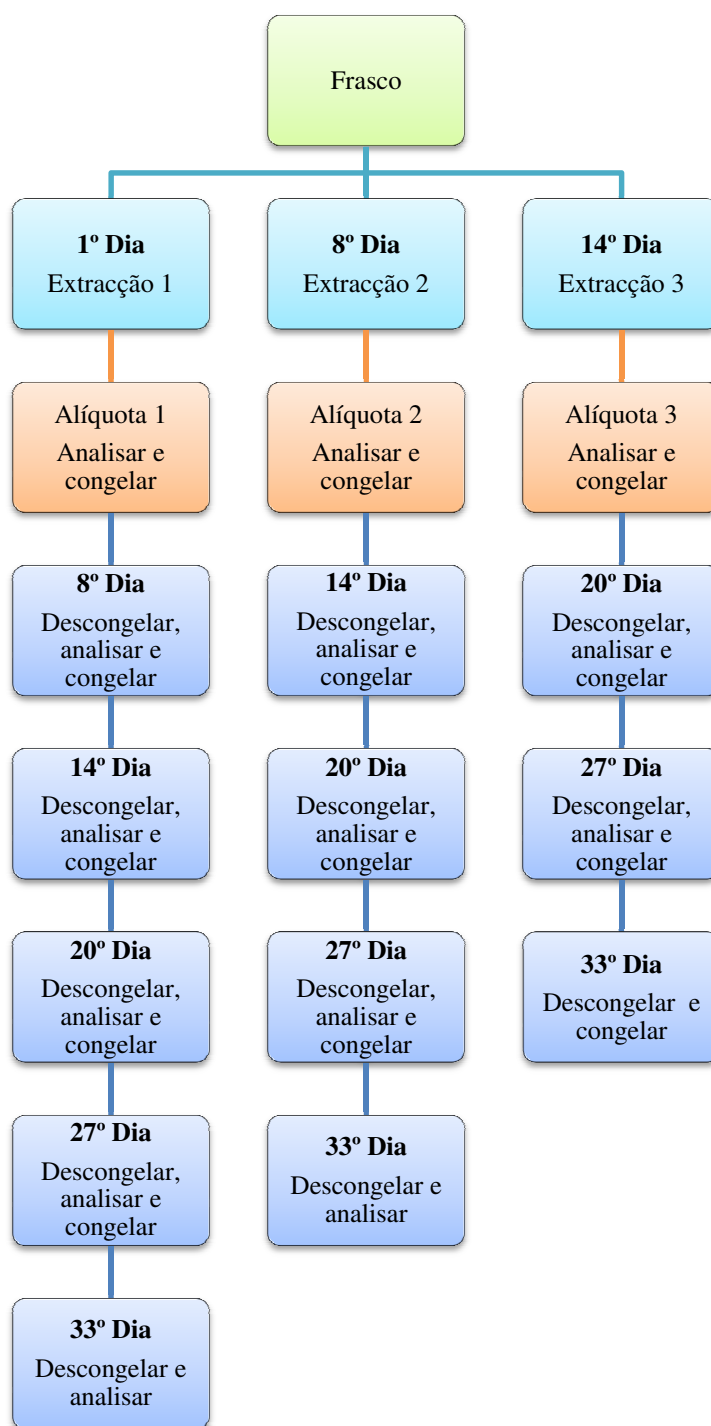


Figura 18 - Metodologia seguida nas amostras congeladas.

### 3.4.2. Amostras Refrigeradas vs Amostras Congeladas

Nesta parte do estudo foram utilizadas amostras de Controlo Externo – RIQAS e de urina de três Pacientes, sendo que algumas foram apenas refrigeradas, outras congeladas e algumas amostras foram simultaneamente refrigeradas e congeladas.

As amostras e alíquotas de urina foram, no caso do Paciente A, sempre congeladas e descongeladas, a uma temperatura de congelação de  $-15 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , as do Paciente B e C sempre refrigeradas, a  $7 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . A temperatura ambiente para descongelação foi cerca de  $25^{\circ}\text{C}$ .

Estas análises foram repetidas durante 3 semanas, com intervalos de 2-3 dias. Seguiu-se um esquema de análise semelhante ao representado na figura 18. No caso de Paciente C apenas se realizou uma extracção, analisando apenas essa alíquota ao longo dos vários dias.

Como amostras de Controlo Externo – RIQAS utilizaram-se quatro frascos, com as referências 42 4, 42 10, 42 11 e 42 13, que foram hidratados e de seguida procedeu-se à extracção de três deles (42 10, 42 11 e 42 13). Tanto os frascos como alíquotas resultantes destas extracções foram refrigerados, a  $7 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte realizou-se uma nova extracção, destes três frascos e reanalisaram-se as alíquotas da 1ª extracção. Depois da 2ª extracção, tanto os frascos como alíquotas foram sempre todos congelados a  $-15 \pm 5^{\circ}\text{C}$ . A temperatura ambiente para descongelação foi cerca de  $25^{\circ}\text{C}$ .

Nesta parte do estudo, procedeu-se desta forma de modo a avaliar a estabilidade destes controlos, uma vez que nas suas bulas, está referido que as catecolaminas são instáveis nas amostras de urina reconstituídas, por isso após a sua reconstituição as amostras devem ser analisadas num período de 2 dias, sendo que a amostra é estável de  $+2$  a  $+8^{\circ}\text{C}$ . Assim, ao proceder desta forma avaliou-se o que ocorreria ultrapassando este período de tempo.

Na figura 19, um esquema simplifica a metodologia seguida nesta parte do estudo. Estas análises foram realizadas durante 25 dias, com intervalos de 7-8 dias, excepto da 1ª extracção para a 2ª como já foi referido.

O outro frasco 42 4 que inicialmente tinha sido apenas hidratado, foi refrigerado a  $7 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante uma semana. Depois realizou-se a sua extracção e precedeu-se de igual forma

nas duas semanas seguintes, sendo que neste caso tanto as alíquotas como o frasco foram sempre refrigerados a  $7 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Na figura 20 está explicado o processo seguido.

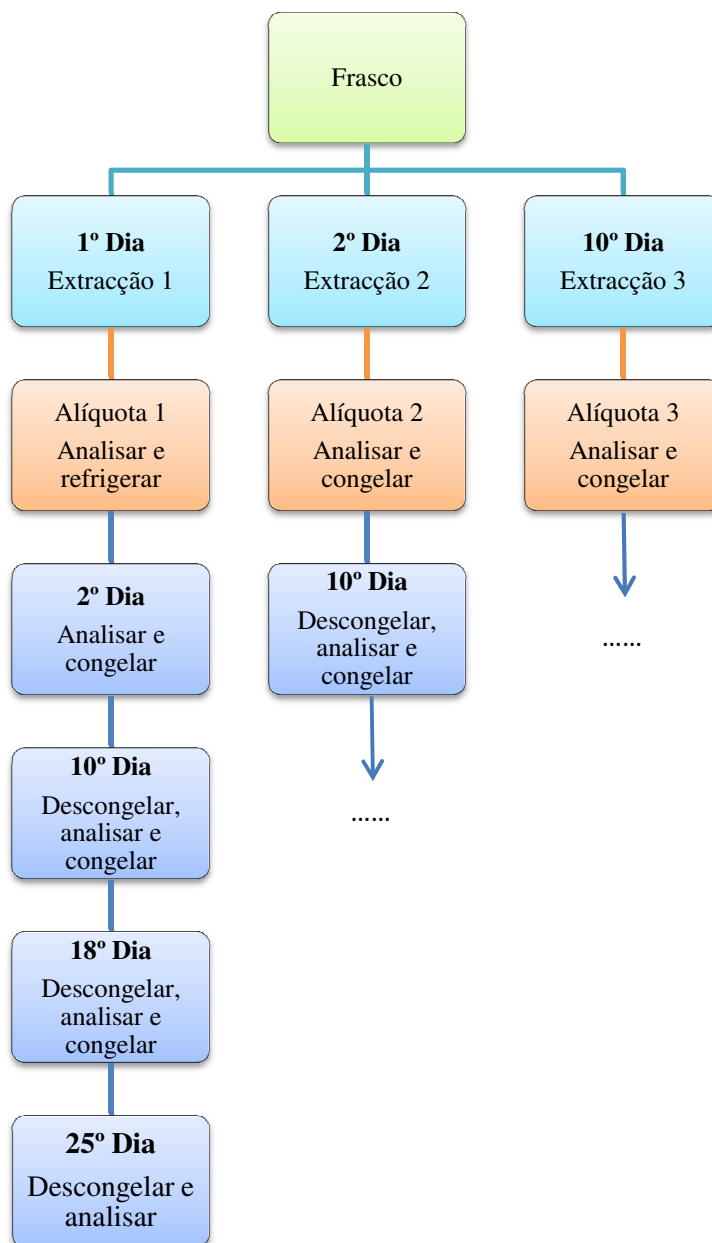


Figura 19 - Metodologia seguida nas amostras de RIQAS 42 10, 42 11 e 42 13.

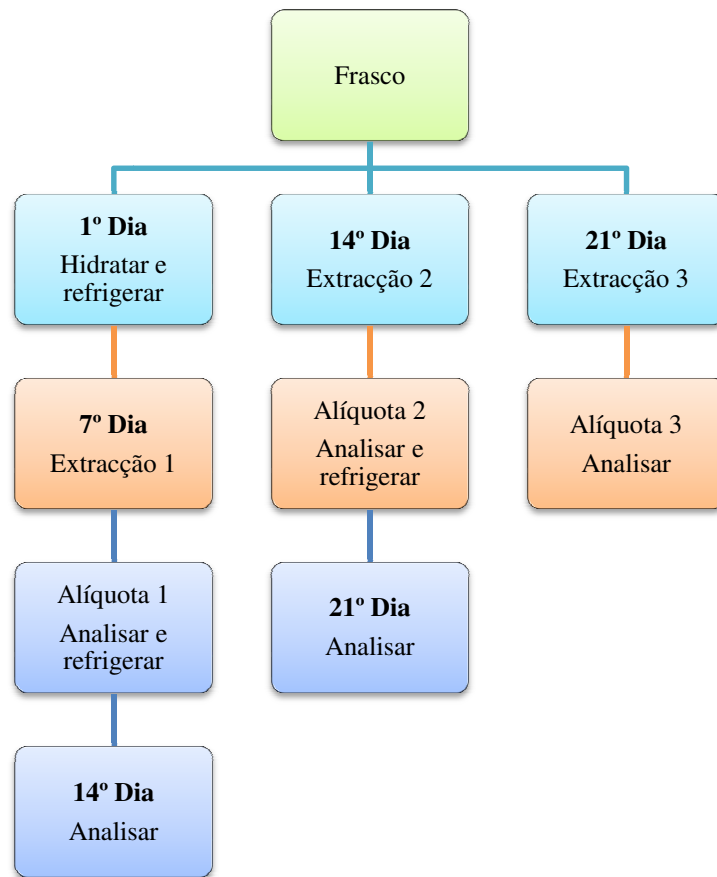


Figura 20 - Procedimento seguido na amostra de RIQAS 42.4.

## 4. Apresentação e Discussão dos Resultados

### 4.1. Calibração do Método

A partir da solução do calibrador obtiveram-se as curvas de calibração das catecolaminas. A calibração é feita automaticamente pelo *software* instalado no equipamento. Na tabela 5 e no gráfico da figura 21 apresenta-se um exemplo de calibração.

Tabela 5 - Exemplo dos resultados da análise da solução calibrador para a determinação das curvas de calibração das catecolaminas (NA, ADR e DA).

	Concentração (µg/L)	Concentração Relativa	Área	Área Relativa
Noradrenalina	111	111	56038755	0,569
Adrenalina	27,8	27,8	10344600	0,105
Dopamina	188	188	140977279	1,432
Padrão Interno	1	1	98447401	1

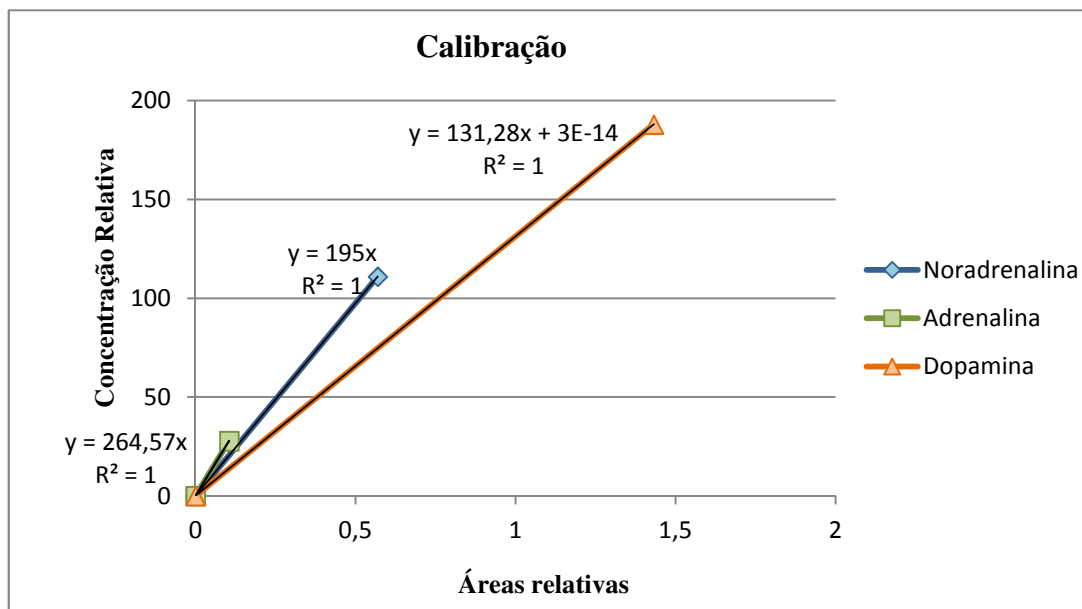


Figura 21 - Curvas de calibração das catecolaminas (NA, ADR e DA).

## 4.2. Análise da *Performance* Cromatográfica

Na figura 22, apresenta-se um exemplo de um cromatograma obtido e na tabela 6, os valores da respectiva análise, determinando-se assim a quantidade de cada catecolamina, para a amostra em questão.

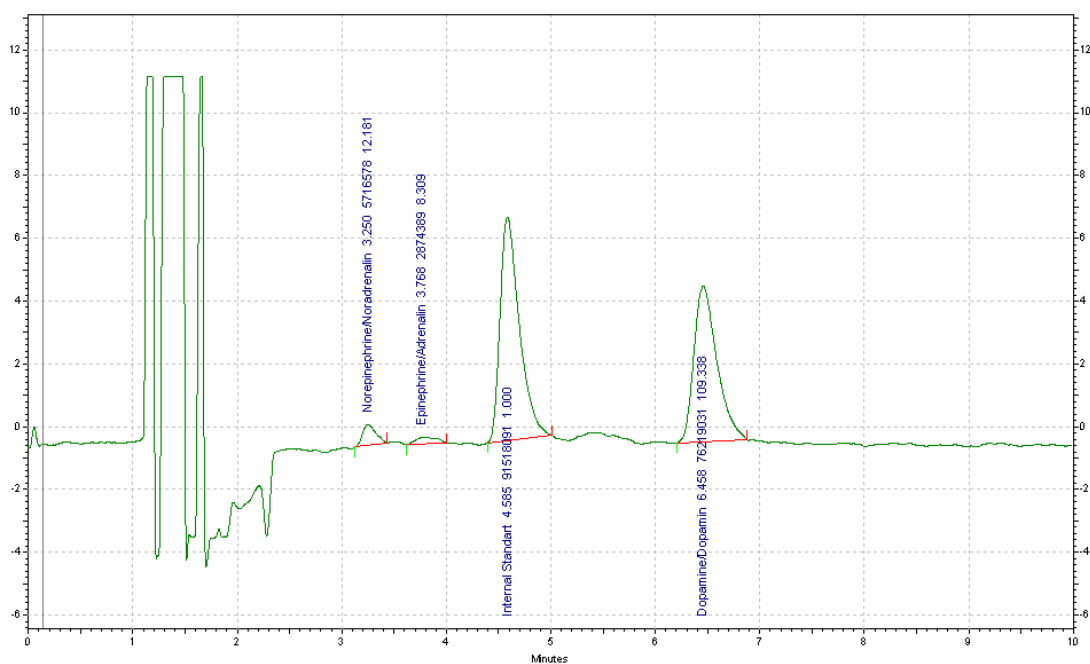


Figura 22 - Cromatograma de uma amostra de urina para análise às catecolaminas (NA, ADR e DA).

Tabela 6 - Resultados da amostra de urina da figura 22.

	Área	Área relativa	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Quantidade no volume de urina de 24h ( $\mu\text{g}$ )
<b>Noradrenalina</b>	5716578	0,075	12,181	25,580
<b>Adrenalina</b>	2874389	0,038	8,309	17,449
<b>Dopamina</b>	91518091	1,201	109,338	229,610
<b>Padrão Interno</b>	76219031	1,000	1,000	2,100

Os valores obtidos para a quantidade no volume de urina de 24h, têm que ser multiplicados pelo volume total de urina, que foi recolhida durante 24h, sendo de seguida comparados com os valores de referência, apresentados na tabela 7, de modo a verificar se esta amostra apresenta valores normais ou anómalos.

Tabela 7 - Valores de referência para as catecolaminas na urina de 24h.

	Valores referência (µg)
<b>Adrenalina</b>	4-20
<b>Noradrenalina</b>	23-105
<b>Dopamina</b>	190-450

De seguida procedeu-se à avaliação da *performance* do sistema cromatográfico, tabela 8, com base no cromatograma anterior, sendo que esta amostra é considerada representativa de todas as outras utilizadas no estudo, pois os tempos de retenção mantiveram-se semelhantes nos vários cromatogramas, não havendo alteração significativa dos parâmetros estudados.

Tabela 8 - Exemplo de cálculos da *performance* cromatográfica para uma amostra.

	$t_r$ (min)	W (cm)	$R_s$	K	$\alpha$	N	H (cm)
Noradrenalina	3,250	0,300	-	3,063	1,211	1067,111	0,014
Adrenalina	3,768	0,400	1,480	4,460	1,477	1273,062	0,012
Padrão Interno	4,585	0,600	1,634	5,231	1,601	778,410	0,019
Dopamina	6,458	0,700	2,882	6,573	-	902,745	0,017

Comprimento da coluna = 15 cm

Analisando os valores, e de acordo com o que está referido na literatura consultada, a coluna utilizada apresenta uma boa resolução, pois os valores de  $R_s$  são superiores a 1,25. Além disso a separação também é completa visto que há valores de  $R_s$  superiores a 1,5.

Relativamente à retenção (K) e com base nestes valores pode-se dizer que esta coluna apresenta uma boa retenção para estes analitos, pois os valores de K, para a amostra analisada estão dentro da gama ideal (2-10).

Além disso, nesta amostra, constata-se que a ADR é o composto para o qual a coluna apresenta maior *performance* (N) na separação, visto que é este composto, que possui maior valor de N, pelo contrário o padrão interno é o composto separado com menor *performance*. Assim, a coluna utilizada apresenta maior eficiência a separar a ADR, relativamente aos outros compostos em questão.

### 4.3. Controlo Externo – RIQAS (Avaliação Externa)

Os resultados da avaliação externa para efeitos de qualidade, vêm sob a forma de um relatório, apresentado no Anexo I.

Na seguinte tabela constam os valores obtidos no laboratório Fernanda Galo Lda e os valores reais para esta análise.

Tabela 9 - Comparação dos resultados do Controlo Externo – RIQAS.

	Catecolaminas ( $\mu\text{g/L}$ )		
	NA	ADR	DA
<b>Valor do Lab. Fernanda Galo Lda</b>	279,132	48,286	275,878
<b>Valor real</b>	256,796	58,832	298,559
<b>Desvio (%)</b>	8,7	17,9	7,6

Os desvios verificados estão dentro do permitido pelo RIQAS, pelo que o método de quantificação e detecção das catecolaminas utilizado neste estudo é adequado para o seu fim, facultando bons resultados.

### 4.4. Estudo da Estabilidade das Catecolaminas

#### 4.4.1. Amostras Congeladas

Na tabela 10 apresentam-se os resultados obtidos e ainda a sua análise estatística.

Para o controlo não foi realizada uma 3ª extracção, pois o frasco desta solução apenas contém 8,0 mL e como em cada preparação de amostra se utilizam 3,0 mL, não existiria volume suficiente para tal. O RIQAS 42 3, também não tem alguns dados visto que o seu estudo foi iniciado mais tarde.

Tabela 10 - Resultados obtidos e sua análise estatística.

	Controlo			RIQAS 43 12			RIQAS 42 3		
	Catecolaminas ( $\mu\text{g/L}$ )								
	NA	ADR	DA	NA	ADR	NA	NA	ADR	NA
Extracção 1	223,6	40,6	266,0	145,1	42,1	111,7	195,1	52,7	178,7
Extracção 2	211,7	38,3	264,7	139,0	36,7	115,0	182,5	49,3	163,2
Extracção 3				135,3	38,6	111,1	183,9	43,5	175,8
$s^2$	70,7	2,6	0,7	24,5	7,7	4,3	47,8	22,0	67,8
s	8,4	1,6	0,9	5,0	2,8	2,1	6,9	4,7	8,2
CV (%)	<b>3,9</b>	<b>4,1</b>	<b>0,3</b>	<b>3,5</b>	<b>7,1</b>	<b>1,8</b>	<b>3,7</b>	<b>9,7</b>	<b>4,8</b>
CV (%) permitido <sup>(1)</sup>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>
Alíq. Ext. 1	220,5	42,0	261,2	137,2	41,1	110,0	195,9	51,4	178,8
Alíq. Ext. 1	170,9	36,1	197,6	138,1	41,9	109,6	195,6	53,3	176,3
Alíq. Ext. 1	220,7	43,3	253,9	139,1	37,1	96,8	195,6	46,8	176,6
Alíq. Ext. 1	215,2	37,4	254,2	152,6	31,3	102,1			
Alíq. Ext. 1	180,2	40,5	268,1	146,9	36,0	99,9			
Alíq. Ext. 2	181,7	38,5	210,9	149,0	40,2	109,9	186,0	48,3	165,7
Alíq. Ext. 2	227,6	44,0	272,9	148,3	41,5	108,0	180,5	50,4	162,0
Alíq. Ext. 2	223,4	39,5	264,1	140,6	37,4	107,5			
Alíq. Ext. 2	172,9	37,9	277,8	142,6	35,1	108,6			
Alíq. Ext. 3				143,2	40,4	108,0	186,1	45,3	174,6
Alíq. Ext. 3				140,5	40,0	109,9			
Alíq. Ext. 3				138,2	36,3	110,3			
$s^2$	584,5	7,4	779,9	25,5	10,2	20,5	43,7	9,0	46,7
s	24,2	2,7	27,9	5,0	3,2	4,5	6,6	3,0	6,8
CV (%)	<b>12,0</b>	<b>6,8</b>	<b>11,1</b>	<b>3,5</b>	<b>8,4</b>	<b>4,2</b>	<b>3,5</b>	<b>6,1</b>	<b>4,0</b>
CV (%) permitido <sup>(1)</sup>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>

(1) Tabela 11

Os vários resultados obtidos, tanto para o Controlo Interno, como para o Controlo Externo – RIQAS, não variam significativamente, ao longo do período analisado. No caso do Controlo Interno, estes valores têm que estar dentro dos limites definidos na tabela 4, para que os resultados obtidos possam ser considerados de confiança, o que ocorre na maioria das análises realizadas, tal como se pode verificar nos gráficos das figuras 23, 24 e 25.

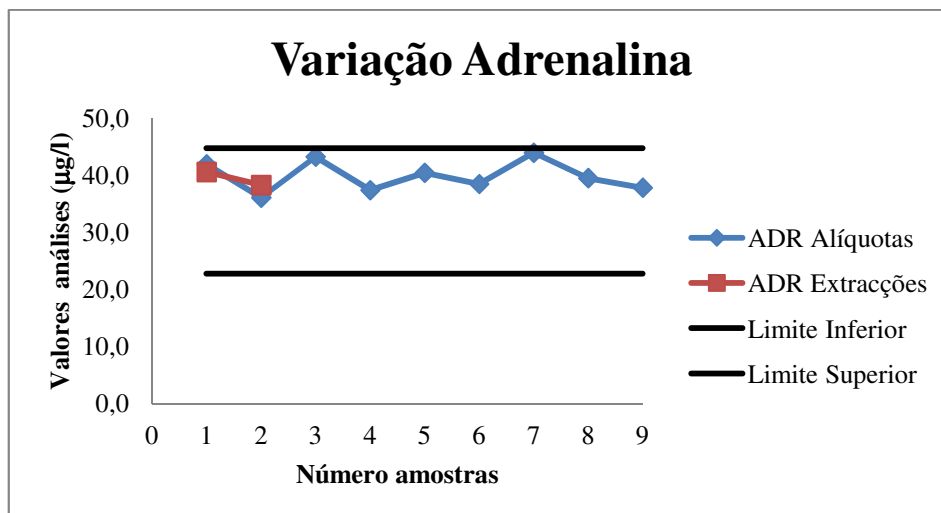


Figura 23 - Variação da adrenalina no Controlo Interno.

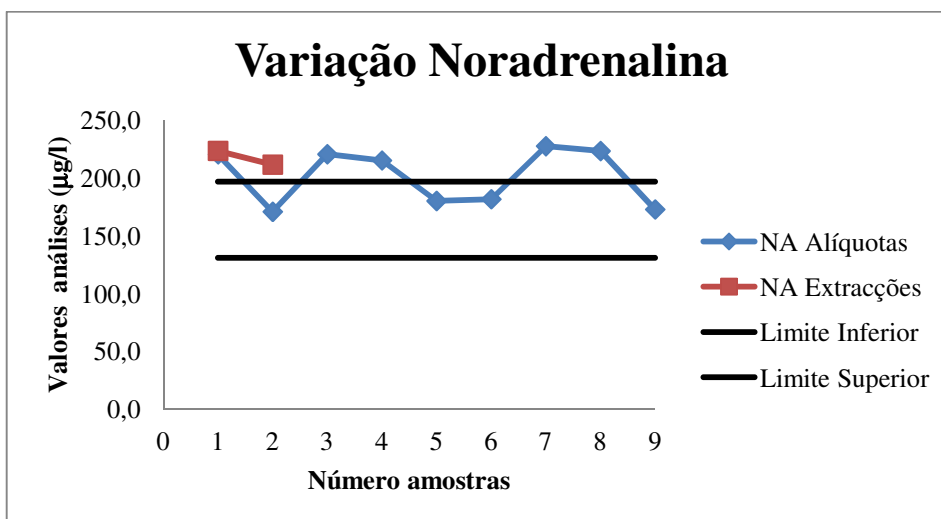


Figura 24 - Variação da noradrenalina no Controlo Interno.

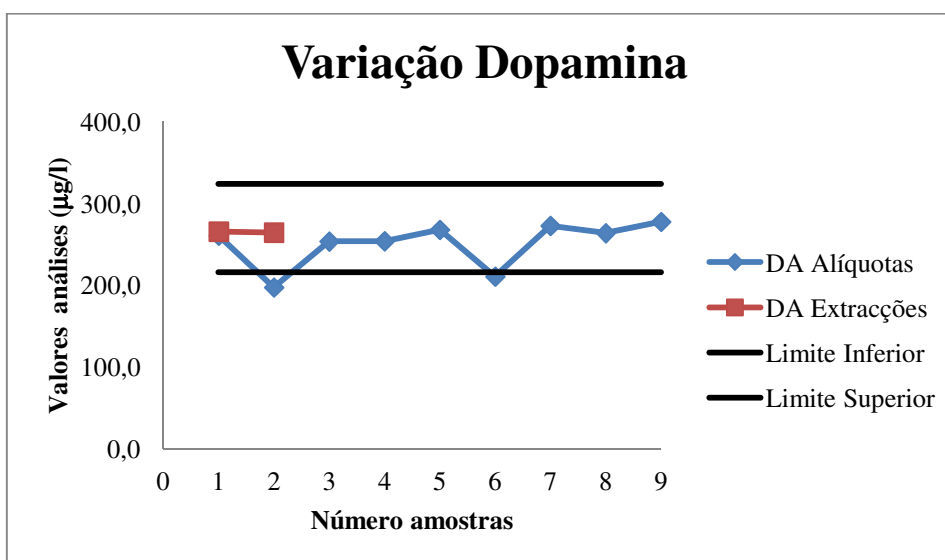


Figura 25 - Variação da dopamina no Controlo Interno.

Na figura 24, verifica-se que o limite superior para a NA foi muitas vezes ultrapassado, o que sugere que o método poderia não estar devidamente calibrado para esta catecolamina.

Da análise dos gráficos também se verifica que estes, não seguem nenhuma tendência, variam de análise para análise, em torno de um valor médio respeitando os limites estipulados que já existem para estes analitos, salvo a exceção da NA.

A dispersão verificada nestes gráficos pode ser explicada, pela elevada sensibilidade do método utilizado.

Relativamente ao tratamento estatístico efectuado aos dados anteriores, foram utilizadas as medidas de dispersão (variância, desvio padrão e coeficiente de variação), de modo a avaliar a maior ou menor variabilidade dos resultados obtidos, ou seja, se estes se concentram ou não ao redor da tendência central de um conjunto de observações (Morais, nd).

Para calcular a variância, desvio padrão e coeficiente de variação (CV), foram utilizadas as seguintes equações:

$$S^2 = \sum_{i=0}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (7)$$

$$s = \sqrt{S^2} = \sqrt{\sum_{i=0}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (8)$$

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (9)$$

Estas medidas de dispersão permitiram comparar os valores que foram obtidos neste estudo, com os valores de erro permitidos para estes analitos, apresentados nas seguintes tabelas, de modo a verificar se o estudo apresentava valores lógicos e concisos.

Tabela 11 - Valores de referência para as catecolaminas fraccionadas (RCPA-QAP, 2012).

Biogenic Amines (Reviewed April 2012)		
Test or Analyte	Lower Goal	Upper Goal
Adrenaline	$\pm 30 \text{ nmol/L} \leq 100 \text{ nmol/L}$	$\pm 30\% > 100 \text{ nmol/L}$
Dopamine	$\pm 0.20 \text{ umol/L} \leq 2.0 \text{ umol/L}$	$\pm 20\% > 1.0 \text{ umol/L}$
5HIAA	$\pm 8 \text{ umol/L} \leq 40 \text{ umol/L}$	$\pm 20\% > 40 \text{ umol/L}$
HMMA	$\pm 6 \text{ umol/L} \leq 40 \text{ umol/L}$	$\pm 15\% > 40 \text{ umol/L}$
HVA	$\pm 6 \text{ umol/L} \leq 40 \text{ umol/day}$	$\pm 15\% > 40 \text{ umol/L}$
Metanephrine	$\pm 0.2 \text{ umol/L} \leq 1.0 \text{ umol/L}$	$\pm 20\% > 1.0 \text{ umol/L}$
Noradrenaline	$\pm 75 \text{ nmol/L} \leq 500 \text{ nmol/L}$	$\pm 15\% > 500 \text{ nmol/L}$
Normetanephrine	$\pm 0.4 \text{ umol/L} \leq 2.0 \text{ umol/L}$	$\pm 20\% > 2.0 \text{ umol/L}$
3 - Methoxytyramine	$\pm 0.3 \text{ umol/L} \leq 2.0 \text{ umol/L}$	$\pm 15\% > 2.0 \text{ umol/L}$
Serotonin	$\pm 0.2 \text{ umol/L} \leq 1.0 \text{ umol/L}$	$\pm 20\% > 1.0 \text{ umol/L}$

Tabela 12 - Valores de referência para as catecolaminas totais (Ricos *et al.*, 1999).

	Analyte	Number of papers	Biological Variation		Desirable specification		
			CVw	CVg	I(%)	B(%)	TE(%)
U-	Total catecolamines, concentration, 24h	1	24.0	32.0	12.0	10.0	29.8

Assim, da análise ao CV para as catecolaminas fraccionadas, verificou-se que os valores são todos inferiores aos do CV permitidos, que contam na tabela 11, sendo que no controlo também se corrobora, que fazendo uma nova extracção os valores não variam tanto, como nas alíquotas que foram congeladas e descongeladas sucessivamente, embora essa variação esteja dentro da gama de valores permitidos.

Estes valores, também foram comparados com o CV permitido para as catecolaminas totais, valores que se encontram na tabela 13, sendo que se constatou, que estes também se encontram dentro dos parâmetros normais. No entanto, no controlo, para as alíquotas que foram congeladas e descongeladas, o valor obtido deu 29,9 e o valor permitido é de 29,8, mas não podemos esquecer, que estes valores vêm acompanhados de vários arredondamentos, dos vários cálculos efectuados, por isso esta diferença pensa-se ser aceitável.

Tabela 13 – Resultados do coeficiente de variação para catecolaminas totais.

	Controlo	RIQAS 43 12	RIQAS 42 3
CV (%) catecolaminas totais ( $\mu\text{g/L}$ ) <b>Extracções</b>	8,3	8,9	18,2
CV (%) catecolaminas totais ( $\mu\text{g/L}$ ) <b>Alíq. Extr.</b>	29,9	16,1	13,6
CV (%) permitido catecolaminas totais ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>(2)</sup>	29,8		

(2) Tabela 12

Assim, com base nos resultados obtidos conclui-se que tanto o Controlo, como o Controlo Externo – RIQAS, são estáveis a operações de congelação e descongelação sucessivas, pelo menos durante um mês. Estes resultados são de grande importância em termos de eficiência dos laboratórios de análises, uma vez que sempre que se realiza uma análise deste tipo é necessário proceder também à análise de controlos. Como os frascos apenas permitem a realização de duas ou três extracções, a sua congelação, sem comprometer a qualidade de prestação dos serviços aos utentes, é uma mais valia para os laboratórios, não só do ponto de vista económico e ambiental, mas também em termos de tempo de análise.

Pode-se ainda concluir, que o Controlo Externo – RIQAS também pode ser hidratado e inclusivamente congelado, não sendo assim necessário realizar a sua análise dentro de dois dias, pois os vários resultados obtidos são perfeitamente aceitáveis, visto que respeitam todos os parâmetros tidos em conta neste estudo.

#### 4.4.2. Amostras Refrigeradas vs Amostras Congeladas

Os resultados das amostras de urina e respectiva análise estatística encontram-se nas seguintes tabelas.

Tabela 14 – Resultados obtidos para amostras congeladas vs refrigeradas.

	Paciente A			Paciente B			Paciente C		
	Catecolaminas								
	NA	ADR	DA	NA	ADR	DA	NA	ADR	DA
Extracção 1	38,2	12,8	490,4	35,0	17,8	207,0	33,8	6,0	146,9
Extracção 2	24,8	16,2	653,7	25,6	17,4	229,6			
Extracção 3	27,8	19,8	574,8	28,2	18,2	214,2			
<b>s<sup>2</sup></b>	<b>49,9</b>	<b>12,0</b>	<b>6674,6</b>	<b>23,8</b>	<b>0,1</b>	<b>133,2</b>			
<b>s</b>	<b>7,1</b>	<b>3,5</b>	<b>81,7</b>	<b>4,9</b>	<b>0,4</b>	<b>11,5</b>			
<b>CV (%)</b>	<b>23,4</b>	<b>21,3</b>	<b>14,3</b>	<b>16,5</b>	<b>2,1</b>	<b>5,3</b>			
<b>CV (%) permitido<sup>(1)</sup></b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>			
Alíq. Ext 1	36,4	13,9	529,4	26,5	16,6	196,3	33,7	5,5	142,4
Alíq. Ext 1	36,3	13,8	382,5	23,2	17,8	183,0	37,3	8,2	142,5
Alíq. Ext 1	34,3	18,1	457,0	29,1	20,4	190,2	32,4	4,9	160,4
Alíq. Ext 1	31,9	17,7	488,2	29,3	17,5	203,9	32,6	3,8	149,4
Alíq. Ext 1	24,7	16,2	485,1	24,7	15,7	209,3			
Alíq. Ext 2	34,8	17,8	656,8	26,7	14,0	211,8			
Alíq. Ext 2	27,5	16,4	617,1	20,8	15,6	211,0			
Alíq. Ext 2	25,4	13,0	582,4	25,6	17,4	232,3			
Alíq. Ext 2	25,3	16,5	626,2	24,0	12,9	223,3			
Alíq. Ext 3	27,0	18,7	563,0	22,5	17,1	209,3			
Alíq. Ext 3	27,9	16,5	548,2	24,6	18,5	201,7			
Alíq. Ext 3	28,6	17,3	591,6	24,6	15,2	213,7			
<b>s<sup>2</sup></b>	<b>28,9</b>	<b>5,9</b>	<b>7891,8</b>	<b>12,8</b>	<b>7,3</b>	<b>456,8</b>	<b>3,8</b>	<b>2,6</b>	<b>54,6</b>
<b>s</b>	<b>5,4</b>	<b>2,4</b>	<b>88,8</b>	<b>3,6</b>	<b>2,7</b>	<b>21,4</b>	<b>2,0</b>	<b>1,6</b>	<b>7,4</b>
<b>CV (%)</b>	<b>16,4</b>	<b>13,6</b>	<b>15,3</b>	<b>13,0</b>	<b>14,8</b>	<b>9,6</b>	<b>5,8</b>	<b>28,4</b>	<b>5,0</b>
<b>CV (%) permitido<sup>(1)</sup></b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>

(1) Tabela 11

Tabela 15 - Coeficiente de variação para catecolaminas totais nas amostras de urina.

	Paciente A	Paciente B	Paciente C
CV (%) catecolaminas totais (µg/L) <b>Extracções</b>	59,0	23,4	-
CV (%) catecolaminas totais (µg/L) <b>Alíq. Extr.</b>	45,3	37,4	39,2
CV (%) permitido catecolaminas totais (µg/L) <sup>(2)</sup>	29,8		

(2) Tabela 12

Analisando os resultados através do CV, para Paciente A, ao nível das catecolaminas fraccionadas, verificasse que tanto os resultados da ADR, como da DA, situam-se dentro dos limites estipulados. A NA ultrapassa aquele valor, tanto nas extracções (+8,4%), como nas alíquotas que foram congeladas e descongeladas (+1,4%). Nas catecolaminas totais, o valor limite é em muito ultrapassado, tanto para as várias extracções (+29,2%), como para as congelações e descongelações (+15,5%). Isto pode indagar que este Paciente poderia ter algum tipo de doença, a urina poderia estar contaminada ou esta poderia ter-se degradado ao longo do tempo devido à variação das condições ambientais, pois a urina degrada-se muito facilmente com a temperatura.

No caso do Paciente B, nas catecolaminas fraccionadas todos os valores estão dentro dos parâmetros permitidos, excepto a NA (+1,5%) no caso das várias extracções realizadas. Para as catecolaminas totais, realizando uma nova extracção o valor está dentro do limite, nas alíquotas esse valor é ultrapassado (+7,6%). Contudo, estes resultados são bastante bons, pois no caso destas amostras, elas foram apenas refrigeradas, o que poderia levar a que os valores estivessem alterados, devido às oscilações de temperatura. Todavia não foi isso que ocorreu, sendo que estes resultados são bastante melhores que os do Paciente A, onde as amostras haviam sido todas congeladas. Portanto, com base nos resultados obtidos, a refrigeração da urina, para este tipo de análises, poderá ser melhor que a congelação.

Relativamente ao Paciente C, como apenas se realizou uma extracção, só se analisou essa alíquota ao longo dos vários dias. Dessa análise, para as catecolaminas fraccionadas os valores situam-se dentro dos limites permitidos. No caso das catecolaminas totais, este valor é um pouco superior (+9,3%), tal como no Paciente B, mas em ambos os casos as amostras foram apenas refrigeradas. Além disso ao realizar apenas uma extracção para este Paciente, caso essa amostra tivesse algum tipo de contaminação não existem outras para comparação, pelo que desprezando esse facto, os resultados foram aceitáveis.

Nas amostras de urina, os valores das várias extracções e alíquotas têm que ser comparados com os valores de referência para as catecolaminas de 24h, que se encontram na tabela 7, de modo a atestar se os resultados são normais ou anómalos. Estas comparações estão representadas nos gráficos das figuras de 26 a 34.

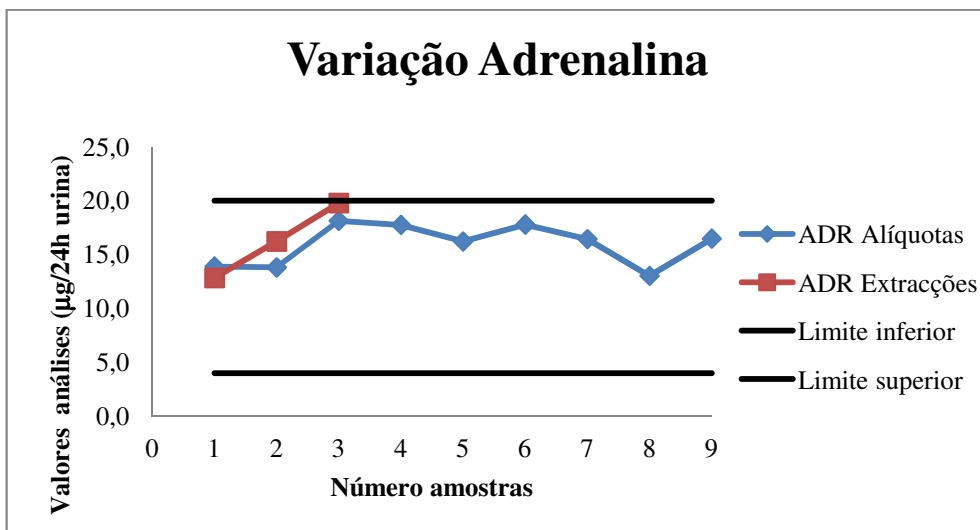


Figura 26 - Variação da adrenalina no Paciente A.

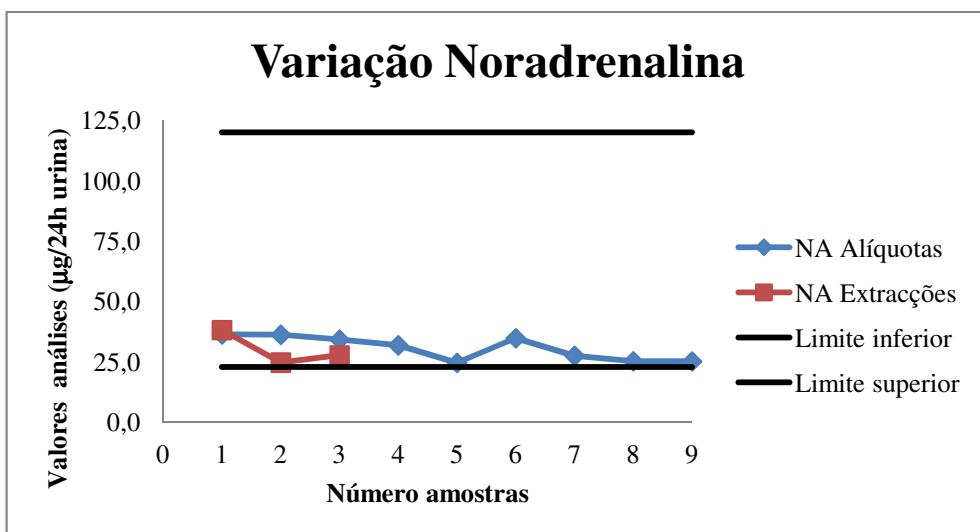


Figura 27 - Variação da noradrenalina no Paciente A.

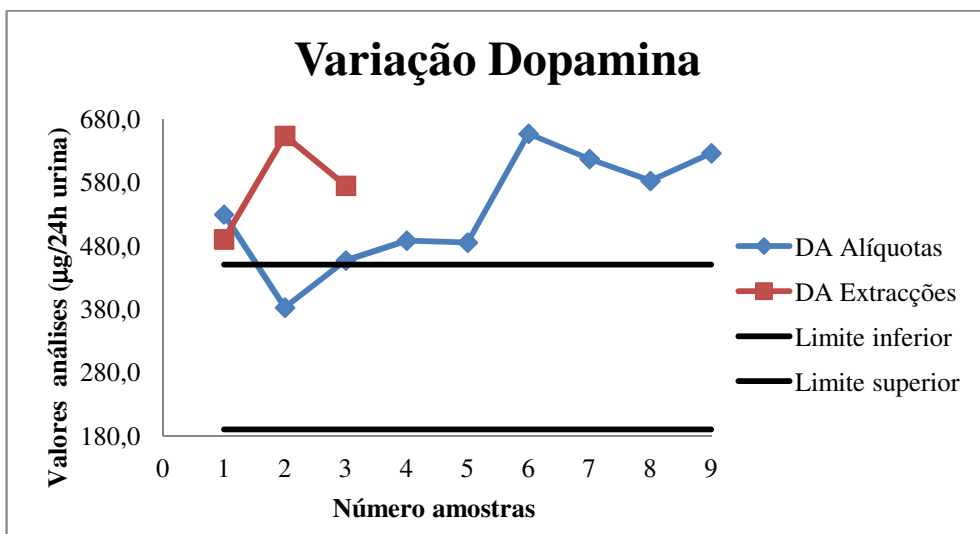


Figura 28 - Variação da dopamina no Paciente A.

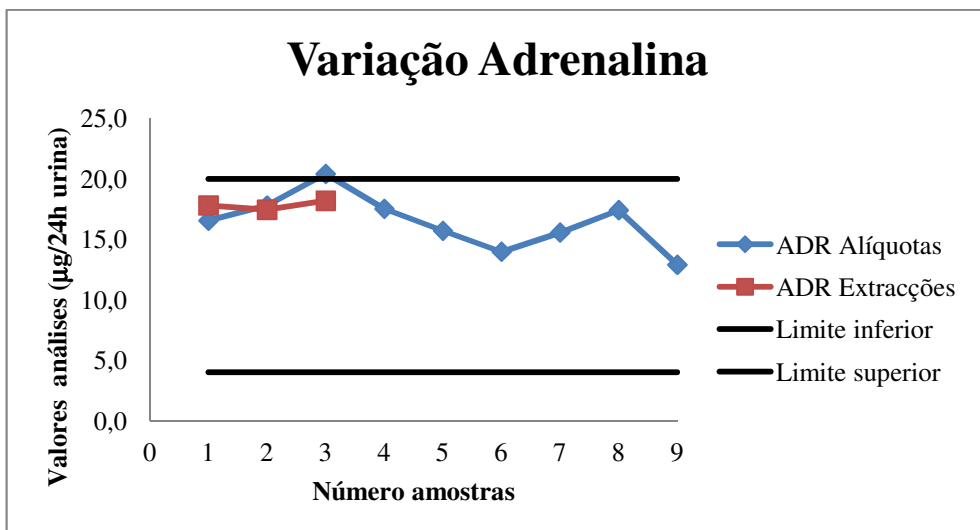


Figura 29 - Variação da adrenalina no Paciente B.

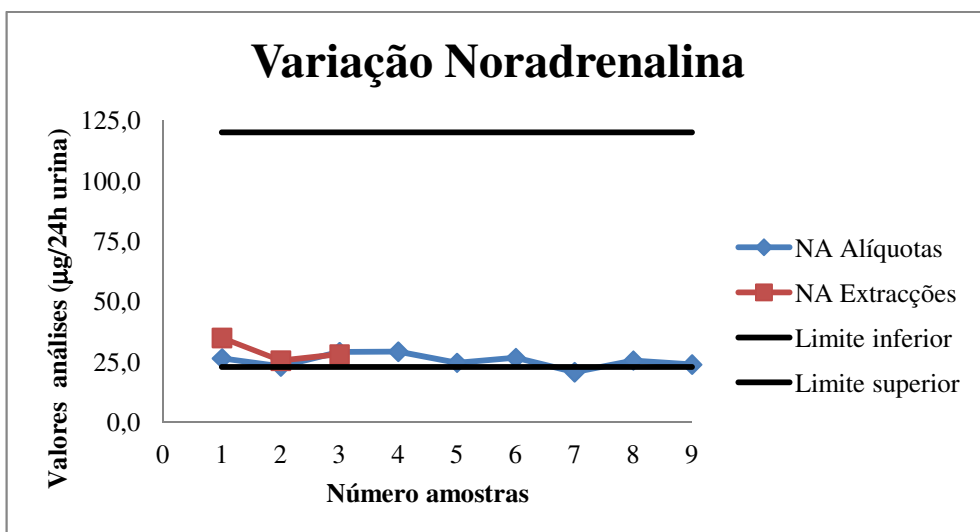


Figura 30 - Variação da noradrenalina no Paciente B.

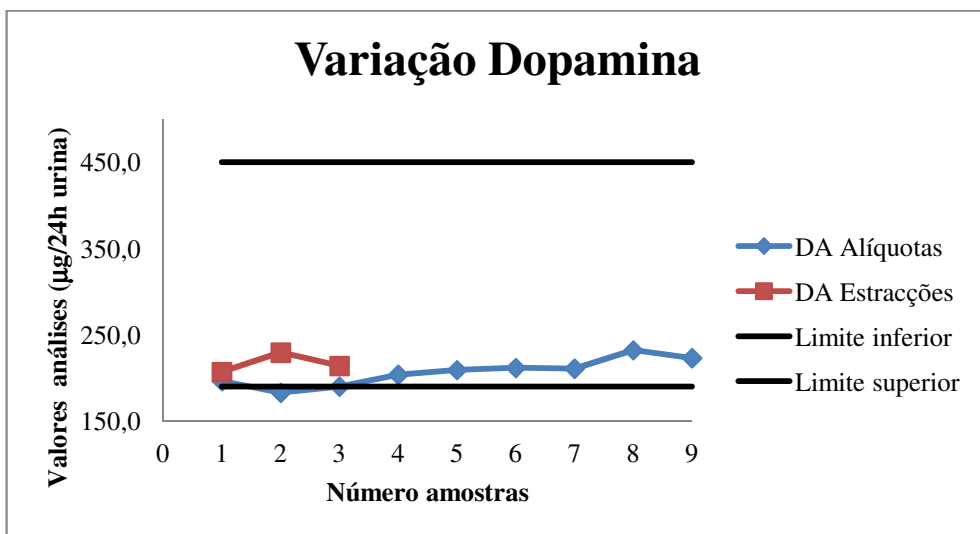


Figura 31 - Variação da dopamina no Paciente B.

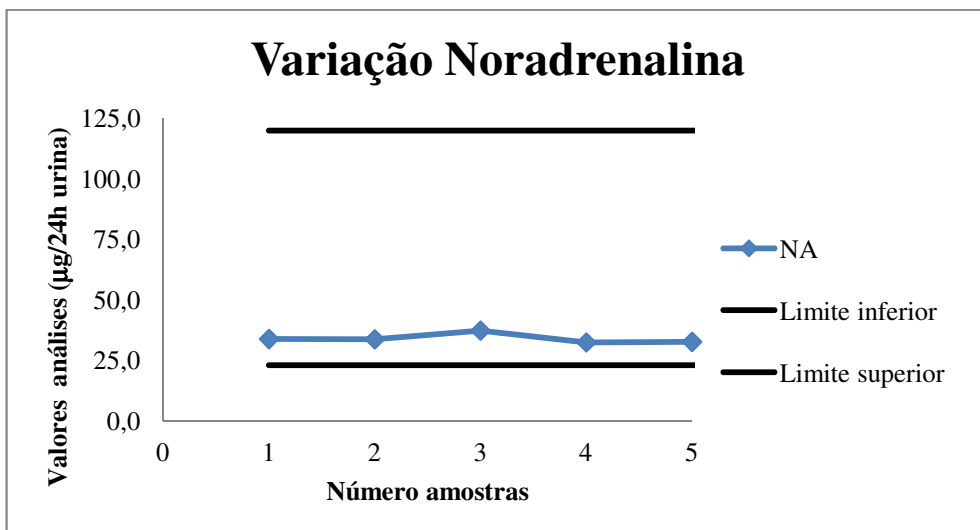


Figura 32 - Variação da noradrenalina no Paciente C.

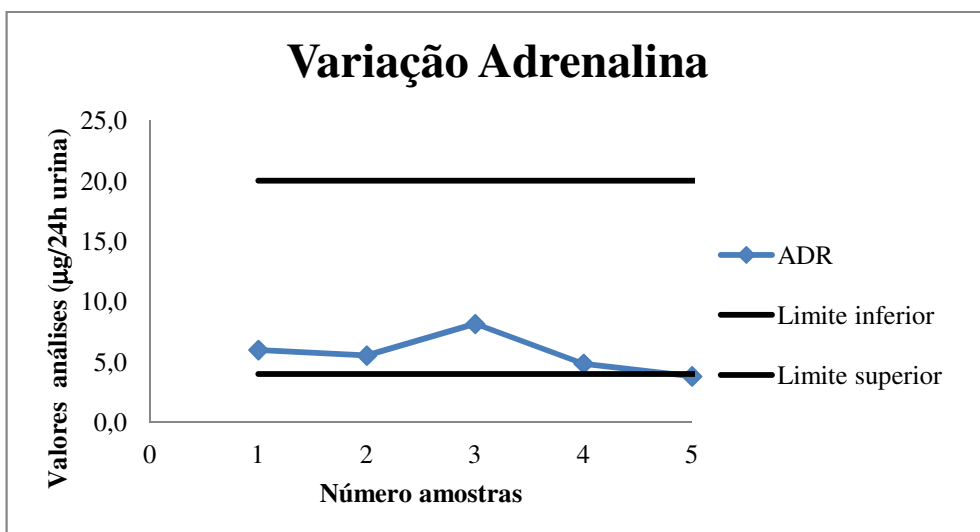


Figura 33 - Variação da adrenalina no Paciente C.

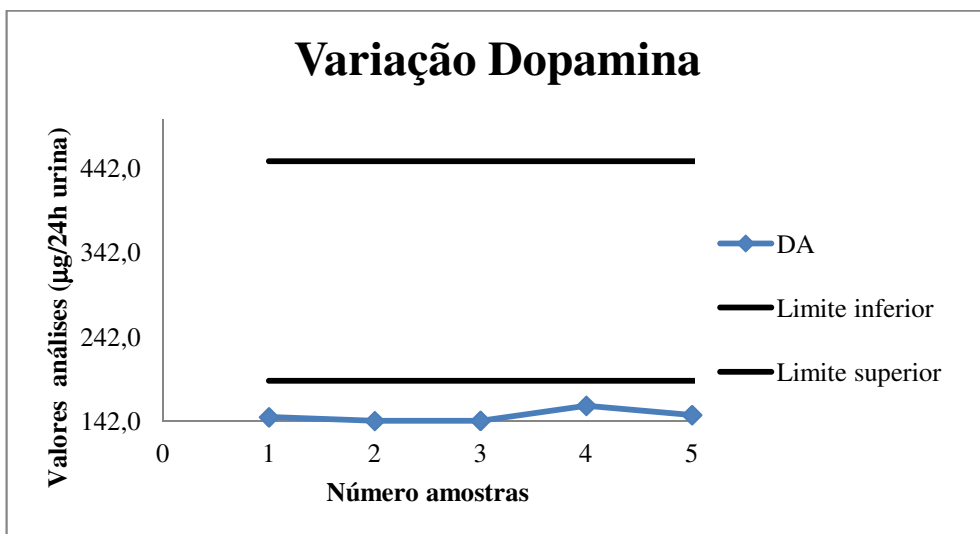


Figura 34 - Variação da dopamina no Paciente C.

Da análise dos gráficos corrobora-se o que já foi dito anteriormente, ou seja, tanto para o Paciente B como C, os valores das várias análises encontram-se dentro dos limites estipulados, salvo raras exceções uma vez que como já se referiu este método é bastante sensível, pelo que qualquer alteração, mesmo que mínima, ao nível das condições ambientais ou do HPLC poderão fazer variar um pouco os resultados.

No Paciente C, também se constatou que a DA está um pouco baixa, o que poderá dever-se a algum tipo de doença mas para isso seria necessário efectuar mais análises, nomeadamente aos metabolitos das catecolaminas.

No caso do Paciente A, este também deveria ter algum tipo de doença, isto porque apesar dos valores obtidos para as catecolaminas ADR e NA estarem dentro dos limites a DA não estava. Esta apresenta resultados bastante altos e a não ser que a amostra contivesse algum tipo de contaminação ou esta tivesse ocorrido no decorrer do trabalho, este Paciente deveria realizar mais análises, tal como o Paciente C de modo a averiguar a situação. Isto porque os valores das catecolaminas estarem alterados poderá ser explicado por uma simples situação de consumo excessivo de café, hipoglicemia, stress severo e até pelo uso de certos medicamentos. Contudo poderá ser algo mais grave como algum tipo de neuroblastoma, esquizofrenia ou doença de Parkinson, visto que nestes Pacientes é a DA que está alterada.

O estudo não foi muito conclusivo, no caso das amostras de urina congeladas, pelo que de futuro, poder-se-ia utilizar mais amostras nestas condições, de modo a ter mais resultados para comparação. Deste modo, do que se obteve, apesar da DA ter resultados bastante elevados, facto que já foi explicado anteriormente, ao congelar as alíquotas destas amostras isso seria benéfico, pois se realmente o Paciente sofresse algum tipo de doença ao congelar a sua amostra, esta poderá ajudar a investigar a evolução da doença ou para pesquisa, além de que também poderá servir para repetir as análises caso fosse necessário.

Este estudo, no caso das urinas, permitiu concluir que o melhor método de armazenamento das amostras é a refrigeração, podendo o período de tempo ser 3 semanas, sem comprometer os resultados das análises.

As amostras de urina poderem ser refrigeradas, é um facto bastante importante para os laboratórios, pois caso estes não tenham muitas amostras para analisar podem esperar uns dias, de modo a terem um conjunto de amostras mais elevado. Isto porque, para realizar

uma análise a apenas uma amostra, tem que se utilizar como soluções um controlo, padrão e calibrador, como já referido anteriormente. Simultaneamente tem que se utilizar a coluna correcta do HPLC para a análise em questão, que neste caso seria às catecolaminas, pelo que o laboratório iria ter imenso desperdício tanto de soluções, reagentes, material, como de energia. Além disso, existe igualmente a necessidade de um operador constante para efectuar estas análises. Portanto e com base neste estudo, para estas análises, as amostras de urina podem ser guardadas, em refrigeração, até se obter um conjunto de amostras razoável que não conduza a desperdícios, sem colocar em causa os resultados das análises dos utentes. Deste modo, o trabalho será mais eficiente, tornando assim o laboratório mais competitivo e amigo do ambiente.

Nas tabelas 16 e 17, encontram-se os resultados das amostras dos Controlos Externos – RIQAS e respectiva análise estatística.

Tabela 16 - Resultados das amostras congeladas e refrigeradas de Controlo Externo – RIQAS.

	RIQAS 42 10			RIQAS 42 11			RIQAS 42 12		
	Catecolaminas								
	NA	ADR	DA	NA	ADR	DA	NA	ADR	DA
Extracção 1	198,8	48,9	181,4	148,2	43,6	156,9	161,8	41,5	168,3
Extracção 2	223,0	40,5	171,6	142,0	42,2	153,5	141,1	38,9	158,4
Extracção 3	189,8	48,0	163,2	147,7	43,4	140,2	139,8	32,7	146,5
$s^2$	294,0	21,3	82,9	11,9	0,5	77,5	152,5	20,7	119,2
s	17,1	4,6	9,1	3,5	0,7	8,8	12,4	4,5	10,9
CV (%)	<b>8,4</b>	<b>10,1</b>	<b>5,3</b>	<b>2,4</b>	<b>1,7</b>	<b>5,9</b>	<b>8,4</b>	<b>12,1</b>	<b>6,9</b>
CV (%) permitido <sup>(1)</sup>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>
Alíq. Ext 1	186,8	42,7	182,5	139,2	40,3	154,8	155,7	46,1	171,0
Alíq. Ext 1	180,7	47,7	172,7	136,5	40,2	149,2	151,6	44,7	157,3
Alíq. Ext 1	184,5	47,7	180,4	147,6	40,4	156,0	160,8	50,7	161,2
Alíq. Ext 1	184,2	45,8	177,9	148,7	39,7	155,3	162,1	41,8	163,4
Alíq. Ext 2	247,3	44,9	187,8	139,8	42,8	145,5	144,1	37,9	151,2
Alíq. Ext 2	230,3	41,3	188,5	144,1	38,4	151,0	142,3	38,6	152,4
Alíq. Ext 2	184,1	42,8	176,7	137,4	40,4	143,7	142,6	38,6	158,5
Alíq. Ext 3	191,0	48,9	164,9	139,7	41,9	131,2	137,8	37,2	137,9
Alíq. Ext 3	188,1	48,8	163,7	147,7	43,5	136,6	138,8	37,8	138,2
$s^2$	575,7	8,2	79,2	29,9	2,5	75,3	87,4	22,3	122,1
s	24,0	2,9	8,9	4,8	1,6	8,7	9,4	4,7	11,1
CV (%)	<b>12,2</b>	<b>6,3</b>	<b>5,0</b>	<b>3,4</b>	<b>3,9</b>	<b>5,9</b>	<b>6,3</b>	<b>11,4</b>	<b>7,1</b>
CV (%) permitido <sup>(1)</sup>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>

(1) Tabela 11

Tabela 17 - Resultados para a amostra refrigerada.

	RIQAS 42 4		
	Catecolaminas		
	NA	ADR	DA
Extracção 1	176,9	42,3	165,8
Extracção 2	228,0	41,4	174,6
Extracção 3	187,8	42,2	174,8
<b>s<sup>2</sup></b>	<b>722,9</b>	<b>0,2</b>	<b>26,4</b>
<b>s</b>	<b>26,9</b>	<b>0,5</b>	<b>5,1</b>
<b>CV (%)</b>	<b>13,6</b>	<b>1,1</b>	<b>3,0</b>
<b>CV (%) permitido<sup>(1)</sup></b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>
Alíq. Ext 1	181,9	42,4	177,6
Alíq. Ext 1	173,9	42,2	169,6
Alíq. Ext 2	182,7	41,5	176,0
<b>s<sup>2</sup></b>	<b>23,6</b>	<b>0,2</b>	<b>17,9</b>
<b>s</b>	<b>4,9</b>	<b>0,5</b>	<b>4,2</b>
<b>CV (%)</b>	<b>2,7</b>	<b>1,1</b>	<b>2,4</b>
<b>CV (%) permitido<sup>(1)</sup></b>	<b>15,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>

(1) Tabela 12

Da análise estatística às catecolaminas fraccionadas, em todos os casos, comparando os vários coeficientes de variação (CVs) com os valores permitidos, todos se situam dentro dos limites, mesmo no caso das amostras apenas refrigeradas e das que foram simultaneamente refrigeradas e depois congeladas.

Estes resultados corroboram ainda mais o que foi confirmado anteriormente sobre o Controlo Externo – RIQAS, podendo assim este depois de hidratado, ser refrigerado ou congelado, visto que em ambos os casos os resultados obtidos respeitavam todos os parâmetros tidos em conta.

Na tabela 18 constam os dados relativos aos CVs para as catecolaminas totais, das várias amostras de Controlo Externo – RIQAS, utilizadas nesta parte do estudo.

Tabela 18 - Coeficiente de variação para catecolaminas totais nas amostras de RIQAS.

	RIQAS 42 10	RIQAS 42 11	RIQAS 42 12	RIQAS 42 4
CV (%) catecolaminas totais ( $\mu\text{g/L}$ ) <b>Extracções</b>	23,8	10,0	27,4	17,7
CV (%) catecolaminas totais ( $\mu\text{g/L}$ ) <b>Alíq. Extr.</b>	23,5	13,3	24,8	6,2
CV (%) permitido catecolaminas totais ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>(2)</sup>	29,8			

(2) Tabela 12

Mais uma vez, se atesta que estes controlos podem ser tanto refrigerados como congelados, sem alterar a boa qualidade dos resultados. Isto porque os valores de CVs para as catecolaminas totais, apresentam todos os valores dentro do limite permitido, tal como se verificou anteriormente na análise às tabelas 16 e 17.

Além disso, o Controlo Externo – RIQAS 42 4, que esteve uma semana em refrigeração e só depois se procedeu à sua extracção, apresenta valores de CVs para as catecolaminas totais mais baixos que os outros controlos, salvo uma excepção (RIQAS 42 11), pelo que neste tipo de controlo utilizando apenas a refrigeração obtêm-se resultados bastante bons.

Com base em todos os resultados deste estudo, conclui-se que o método utilizado mostrou ser sensível e específico, pois ele conseguiu detectar pequenas variações de concentração das catecolaminas estudadas. Além de que determinou exactamente cada um dos compostos específicos da amostra, independente dos outros que lá constavam. Assim sendo, constatou-se que tanto os controlos como as amostras de urina são estáveis, analisando o parâmetro catecolaminas urinárias, tanto ao nível da temperatura como do período de tempo decorridos neste estudo.

## 5. Conclusões

A cromatografia líquida de alta eficiência é um dos métodos cromatográficos mais modernos, que com o passar dos anos tem vindo a ser aprimorada a fim de se tornar um método cada vez mais eficaz na separação e quantificação de compostos. Os seus equipamentos são de elevado custo, mas se for tido em consideração a quantidade de análises que se pode efectuar, é um investimento que trás retorno. Assim a sua utilização em vários laboratórios tem-se vindo a tornar indispensável.

O facto de poder combinar o alto poder de resolução de HPLC, com a elevada sensibilidade da detecção electroquímica, permitiu estabelecer um método mais rápido para a determinação das catecolaminas e dos seus metabolitos na urina, contribuindo para que esta técnica se tornasse uma das mais poderosas técnicas bioanalíticas disponíveis.

Das várias análises efectuadas tanto, às amostras de urina como dos controlos interno e externo, verificou-se que as catecolaminas urinárias analisadas permaneciam estáveis ao longo do tempo, salvo raras excepções, quando sujeitas a operações de refrigeração ou congelação/descongelação ou simultaneamente a refrigeração e congelação/descongelação. Além disso, o método utilizado mostrou ser exacto, pois a análise ao Controlo Externo – RIQAS, que serviu para efeitos de avaliação externa, teve um bom desempenho.

Da análise à *performance* cromatográfica verificou-se que, a coluna utilizada apresentou tanto uma boa resolução como boa retenção para os analitos analisados. Também se constatou que a ADR era o composto para o qual a coluna apresentava maior *performance* na separação.

Conclui-se com a realização deste trabalho que as amostras de Controlo Interno podem ser congeladas, durante cerca de um mês, a uma temperatura de  $-15 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , sem alterar significativamente os seus resultados. Isto porque neste controlo das três catecolaminas analisadas, apenas a NA apresentou valores um pouco anómalos, facto que já foi discutido anteriormente, sendo que as outras obtiveram resultados bastante bons. Relativamente às amostras de urina, estas podem ser tanto refrigeradas como congeladas, embora o melhor método seja a refrigeração visto que foi onde se obtiveram resultados mais precisos e conclusivos, pois para se ter mais certezas acerca do efeito da congelação na urina dever-se-iam ter utilizado mais amostras nestas condições, uma vez que a amostra utilizada, Paciente A, apresentou valores um pouco anómalos para a DA. Esse facto, como discutido

anteriormente, poderia dever-se a algum tipo de doença ou outra situação como uma contaminação da respectiva urina, mas para isso seriam necessárias mais análises, nomeadamente aos metabolitos da urina para descartar a hipótese de algum tipo de tumor do sistema cromafim. O Paciente C também apresentou valores de DA um pouco alterados, mas tal como na situação anterior, para se provar a existência de alguma doença seriam necessárias mais análises. Assim sendo, com base nos resultados desta parte do estudo, estas amostras devem ser refrigeradas a cerca de  $7 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , podendo estar armazenadas nestas condições durante 3 semanas a fim de executar as respectivas análises. No caso do Controlo Externo – RIQAS, este depois de hidratado, pode ser tanto refrigerado, a  $7 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , como congelado,  $-15 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , pois não se verificaram alterações significativas nestas análises utilizando diferentes temperaturas, durante um período de tempo de cerca de um mês.

O trabalho desenvolvido foi importante pois permitiu tirar conclusões das quais não existiam estudos e que são extremamente importantes para a gestão laboratorial sem colocar em causa o utente. Isto porque, com este estudo constatou-se que os laboratórios podem ser mais eficientes, para isso basta apenas reutilizarem os controlos, refrigerando ou congelando-os, e terem um conjunto razoável de amostras para analisar. Assim, de futuro tornar-se-ão mais competitivos e originaram menos resíduos.

O estágio realizado foi bastante positivo para a minha formação, permitiu a aquisição de conhecimentos abrangentes sobre o quotidiano de um laboratório de análises e sobre as boas práticas laboratoriais, bem como a aquisição de conhecimentos especializados sobre cromatografia líquida de alta eficiência e técnicas analíticas de determinação de catecolaminas urinárias.

## 6. Sugestão para Trabalho Futuro

Realizar testes durante um período de tempo mais longo, utilizando mais amostras tanto de urina como de controlo.

Executar um estudo semelhante a este, mas em vez de se analisarem as catecolaminas urinárias, estudar as metanefrinas ou o VMA e HVA. Além de que também se poderiam analisar as catecolaminas plasmáticas.



## 7. Referências Bibliográficas

- Adão, D. (nd). *Métodos Cromatográficos*. Faculdade Educacional de Araucária. Consultado em: [http://200.195.174.230/Materiais/1977\\_787.pdf](http://200.195.174.230/Materiais/1977_787.pdf), a 10 de Fevereiro de 2014.
- Argenton, A. (2010). *Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC)*. Minicursos 2010. Conselho Regional de Química – IV Região (SP). São José do Rio Preto. Consultado em: [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos\\_hplc\\_2010.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf) a 12 de Fevereiro de 2014.
- Bottoli, C. B. G. (2007). *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. Instituto de Química, UNICAMP.
- Brandan, N. C., Llanos, I. C., Ruiz, D. A. N. D., Rodríguez, A. N. (2010). *Hormonas Catecolamínicas Adrenales*. Cátedra de Bioquímica - Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Consultado em: <http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/catecolaminas.pdf>, a 9 de Abril de 2014.
- Cartum, J. (2010). *Variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma disseminado*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina.
- Cortes, M. X. (2010). *Exercício Aeróbico Regular Restaura os Níveis de Catecolaminas em Glândulas Supra-Renais de ratos com Hiperfenilalaninemia*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Educação Física.
- Costa, L., Gomes A. (2008). *Feocromocitoma*. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Arquivos de Medicina, 22, 177-187.
- Degani, A. L. G., Cass, Q. B., Vieira, P. C. (1998). *Cromatografia um breve ensaio*. Atualidades em Química, Química Nova, 7, 21-25.

De Nicola, A. F. (2003). *Fisiología de la médula suprarrenal. Fisiologia Humana de Houssay*, 7ª Edição, Editorial El Ateneo, Sección VII, 52, 671-678.

EURACHEM 1998. *The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.*

Ferreira, K. S. T. (2012). *Validação de métodos de análises cromatográficas: determinação de HCl.* Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Qualidade.

Ferro, S. A. (2010). *Validação de Métodos Cromatográficos para a Análise de Medicamentos.* Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo de Qualidade.

García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E. M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V. (2011). *Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines.* International Journal of Food Microbiology, 48, 115-120.

Gomes, S. M. C. (2010). *Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica.* Dissertação apresentada à Universidade Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química no ramo de Controlo de Qualidade e Ambiente.

Gomes, S. V. F. (2009). *Desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para diferenciação de genótipos de Lippia gracilis Schauer.* Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Pós-Graduação em Química. São Cristóvão.

Fitzgerald, P. A. (2011). *Capítulo 11: Adrenal Medulla and Paraganglia.* Basic & Clinical Endocrinology, 9ª Edição, Lange Medical Books, Mc Graw-Hill.

Hennion, M. C. (1999). *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 856, 3-54.

- ISO/TS 13530. (2009). *Water quality - guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*, Switzerland, 1-38.
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., Alvarez, M. A. (2010). *Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines*. Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Current Nutrition & Food Science, 6, 145-156.
- Lanças, F. M. (1993). *Cromatografia em Fase Gasosa*. 1ª Edição, São Carlos: Acta Eventos, 1, 240.
- Maldaner, L., Jardim, I. C. S. F. (2009). *O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência*, Química Nova, São Paulo, 32, 214-222.
- Morais, C. (nd). *Descrição, análise e interpretação de informação quantitativa - Escalas de medida, estatística descritiva e inferência estatística*. Escola Superior de Educação – Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Oliveira, D., Rosa A. B. (nd). *Glândulas Adrenais: resposta hormonal ao exercício*. Curso de Educação Física, Instituto Luterano de Ensino Superior de Porto Velho. Consultado em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABIIUAE/adrenais>, a 23 de Julho de 2014.
- Paschoal, J. A. R., Rath, S., Airoidi, F. P. S., Reyes, F. G. R. (2008). *Validação de Métodos Cromatográficos para a Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos*. Química Nova, 31, 1190-1198.
- Pombeiro, A. L. O. (2003). *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*, 4ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 18, 434-617.
- Raghavan, R., Joseph J. C. (2007). *Chromatographic Methods of Analysis: High Performance Liquid Chromatography*. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, James Swarbrick, USA, 1, 526-537.
- RCPA-QAP. (2012). *Revision of Allowable Limits of Performance*. Chemical Pathology, Austrália.

- Ricos, C., Alvarez, V., Cava, F., Garcia-Lario, J. V., Hernandez, A., Jimenez, C. V., Minchinela, J., Perich, C., Simon, M. (1999). *Current databases on biologic variation: pros, cons and progress*. Scand J Clin Lab Invest, 59, 491-500. Consultado em: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm#albumin>, a 24 de Julho de 2014.
- Rutz, J. K. (2009). *Avanços na Cromatografia Líquida*. Seminários em Alimentos, Bacharelato em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.
- Sarah, K. B. (2005). *Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH)*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 38,798-805.
- Silva, R. S. A. (2006). *Desenvolvimento de uma metodologia de HPLC para detecção de Aductos das Catecolaminas com a GSH em amostras biológicas*. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia.
- Soares, J. B. (2006). *Neurotransmissores*. Aula teórica nº 4, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto.
- Synder, L.R., Dolan, J. W. (1996). *Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development - use of starting gradient run*. Journal of Chromatography A, 721, 3-14.
- Tonhi, E., Collins, K. E., Jardim, I. C. S. F., Collins, C. H. (2002). *Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados*. Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Química Nova, 25, 616-623.

# Anexo I - Relatório do Controlo Externo – RIQAS

LABORATORY REF. NO. 6928/E

LAC Dra. Fernanda Galo Lda

## HUMAN URINE

CYCLE 45 SAMPLE 1

### Explanation of codes used in this report

R - Results removed due to reconstitution error  
N - No result returned  
C - Result corrected

Authorised by: Stephen Doherty, RIQAS Manager

Issue No: 1

Issue Date: 08/07/2014

Randox Laboratories Limited  
55 Diamond Road  
CRUMLIN BT29 4QY  
Tel: +44 (0)28 9445 4399  
Fax: +44 (0)28 9445 4398  
Email: mail@riqas.com

Page 1

**RIQAS**

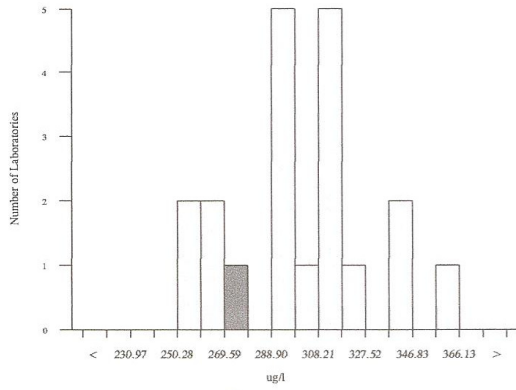


### Dopamine, ug/l

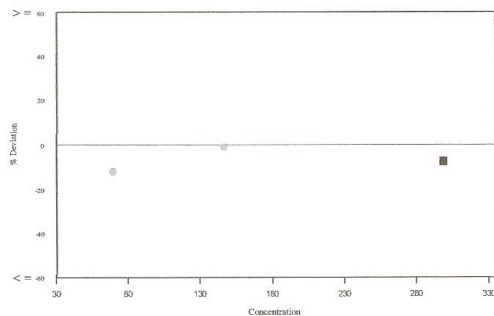
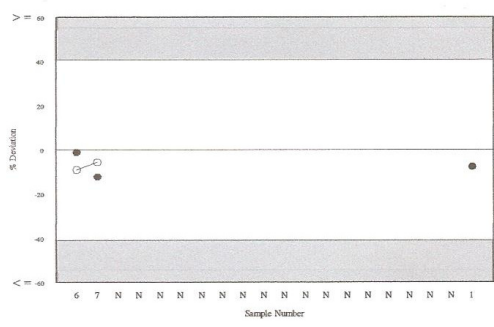
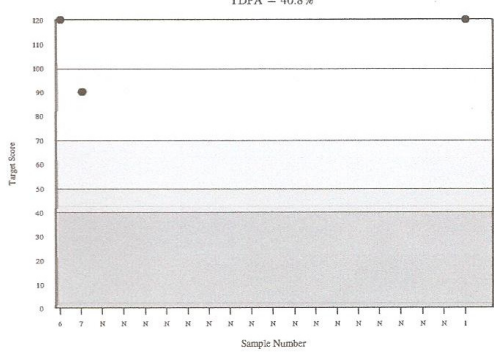
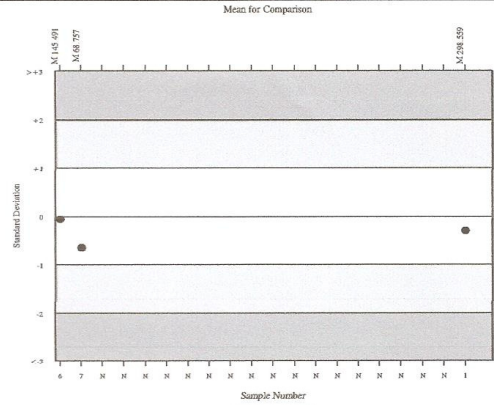
	N	Mean	CV%	U <sub>m</sub>	SDPA	Exc.
<input type="checkbox"/> All Methods	19	298.559	8.6	7.38	74.06	1
<input type="checkbox"/> HPLC	19	298.559	8.6	7.38	74.06	1
<input checked="" type="checkbox"/> Beckman Coulter DU Series	1	275.878	0.0	0.00	N/A	0

<input checked="" type="checkbox"/> Your Result	275.878	SDI	-0.31
		RMSDI	Too Few
<input type="checkbox"/> Mean for Comparison	298.559	TS	120
		RMTS	Too Few
		%DEV	-7.6
		RM%DEV	Too Few

Acceptable limits derived from Biological Variation	N/A
Acceptable limits of performance for RIQAS	40.80%



Method	N	Mean	CV%	U <sub>m</sub>
HPLC	19	298.559	8.6	7.38

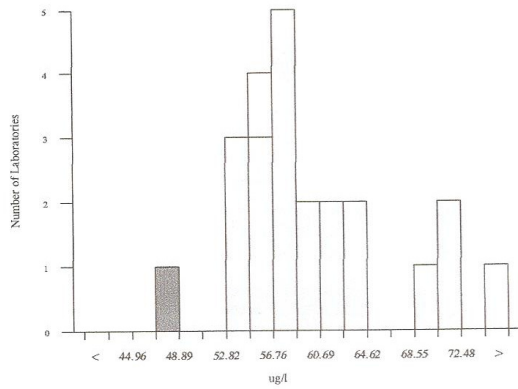


### Epinephrine, ug/l

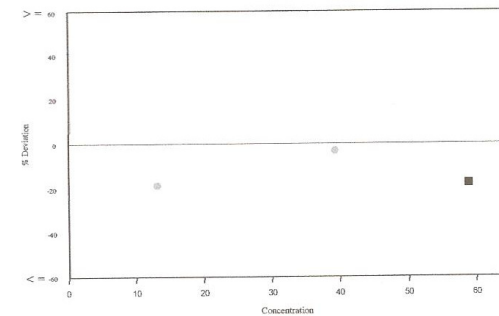
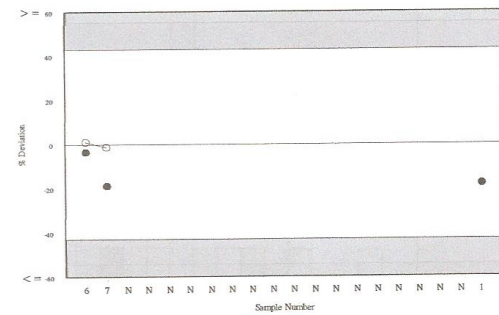
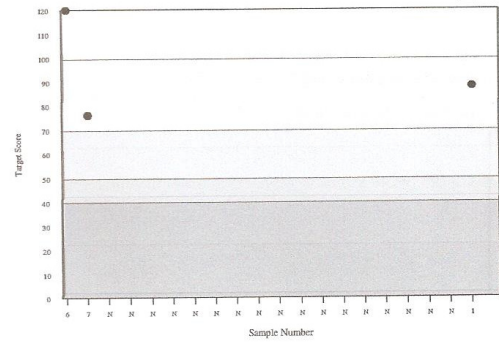
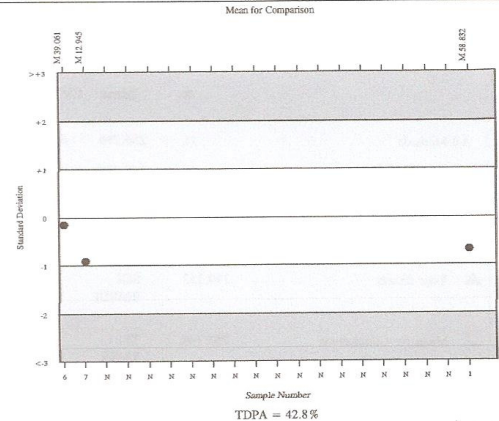
	N	Mean	CV%	U <sub>m</sub>	SDPA	Exc.
<input type="checkbox"/> All Methods	21	58.726	8.9	1.43	15.28	2
<input type="checkbox"/> HPLC	20	58.832	9.1	1.50	15.31	1
<input checked="" type="checkbox"/> Beckman Coulter DU Series	1	48.286	0.0	0.00	N/A	0

<input checked="" type="checkbox"/> Your Result	48.286	SDI	-0.69
		RMSDI	Too Few
<input type="checkbox"/> Mean for Comparison	58.832	TS	88
		RMTS	Too Few
		%DEV	-17.9
		RM%DEV	Too Few

Acceptable limits derived from Biological Variation	N/A
Acceptable limits of performance for RIQAS	42.80%



Method	N	Mean	CV%	U <sub>m</sub>
HPLC	20	58.832	9.1	1.50

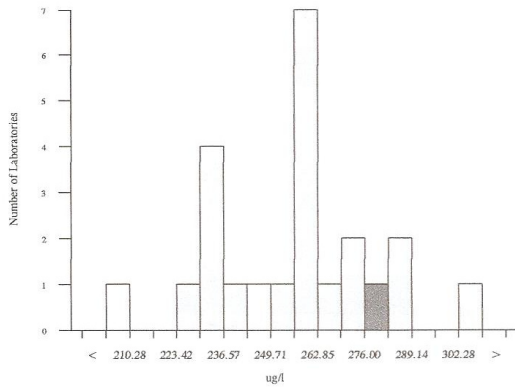


### Norepinephrine, ug/l

	N	Mean	CV%	U <sub>m</sub>	SDPA	Exc.
<input type="checkbox"/> All Methods	21	256.286	6.8	4.78	49.86	2
<input type="checkbox"/> HPLC	20	256.796	6.9	4.98	49.96	1
<input checked="" type="checkbox"/> Beckman Coulter DU Series	1	279.132	0.0	0.00	N/A	0

<input checked="" type="checkbox"/> Your Result	279.132	SDI	0.45
		RMSDI	Too Few
<input type="checkbox"/> Mean for Comparison	256.796	TS	107
		RMTS	Too Few
		%DEV	8.7
		RM%DEV	Too Few

Acceptable limits derived from Biological Variation	N/A
Acceptable limits of performance for RIQAS	32.00%



Method	N	Mean	CV%	U <sub>m</sub>
HPLC	20	256.796	6.9	4.98

